



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**O PAPEL DE DETERMINANTES PLASMÍDICOS NA
RESISTÊNCIA A COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS EM
*Staphylococcus aureus***

CLÁUDIA ALEXANDRA TORMENTA PALMA

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
EM MICROBIOLOGIA MÉDICA**

DEZEMBRO DE 2013



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**O PAPEL DE DETERMINANTES PLASMÍDICOS NA
RESISTÊNCIA A COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS EM
*Staphylococcus aureus***

CLÁUDIA ALEXANDRA TORMENTA PALMA

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
MICROBIOLOGIA MÉDICA**

Orientadora: Professora Doutora Isabel Couto

Laboratório onde o trabalho experimental foi desenvolvido:

Grupo de Micobactérias, Unidade de Microbiologia Médica

Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa

DEZEMBRO DE 2013

A presente Dissertação não foi redigida segundo o novo Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa, por opção do autor.

Os resultados apresentados nesta Dissertação foram objectivo de submissão em co-autoria da seguinte comunicação sob a forma de Poster:

Cláudia Palma, Sofia S. Costa, Elisabete Junqueira, José Melo-Cristino, Miguel Viveiros, Isabel Couto. 2013. The role of plasmid determinants in antimicrobial agents resistance in *Staphylococcus aureus*, abstr. S4:P271 (p. 345). Congresso Nacional de Microbiologia, MicroBiotec13, Aveiro (Portugal), 6 a 8 de Dezembro, 2013.



O trabalho experimental desta Dissertação foi realizado no âmbito do projecto de investigação científica intitulado “Helper compounds against multidrug resistant bactéria: revealing their mechanism of action” com referência PTDC/BIA/MIC/105509/2008, financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia.

Agradecimentos

Gostaria de começar por agradecer a ajuda e o apoio de algumas pessoas que, directa ou indirectamente, deram o seu contributo para este trabalho. Sem a sua ajuda e apoio esta Tese de Mestrado não teria sido possível.

À Professora Doutora Isabel Couto por me ter aceite como aluna, pela orientação, conselhos e conhecimentos transmitidos no decurso deste trabalho. Pela disponibilidade e dedicação que me prestou no decorrer deste ano e por ter estimulado o meu “pensamento positivo”.

Ao Professor Doutor Miguel Viveiros por me ter proporcionado a oportunidade de realizar esta Tese no Grupo de Micobactérias.

Ao Professor Doutor José Melo-Cristino, Director do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Santa Maria, pela cedência dos isolados clínicos estudados nesta Dissertação.

À Professora Doutora Ilda Sanches, da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, pelo acesso à utilização do aparelho de PFGE no seu laboratório e à sua equipa pela gentileza com que nos recebeu.

À Sofia, por toda a ajuda, apoio e conhecimentos que partilhou comigo ao longo de todo o trabalho. Pelo incentivo, pelos conselhos, por ter ouvido os meus desabafos, pela dedicação e paciência, muito obrigada!

Aos meus colegas do Grupo de Micobactérias, especialmente à Diana e à Elisabete pela ajuda, companheirismo e boa disposição demonstrados.

Aos meus colegas de Mestrado, Ana, Andreia, Carlos e Carolina, pela entre-ajuda, pela constante disponibilidade, pelas barrigadas de riso e os bons momentos que partilhamos. Muito obrigada por me ajudarem a ultrapassar estes dois anos, minhas “Maçãs Podres”...

Aos meus amigos de (e para) sempre, Su, Tiago, Cátia, Simone e Hugo, com quem sei que posso sempre contar. Um profundo obrigado pelo total apoio que demonstraram

nas decisões que tive que tomar ao longo deste ano, pela paciência que tiveram para ouvir os meus dramas e desabafos e por me fazerem sempre ver o lado bom das coisas. Agradeço por sempre me apoiarem e nunca me deixarem desistir.

Por último, mas não menos importante...

Aos meus Pais e Avó por sempre se preocuparem com as horas a que eu chego a casa. Por terem a paciência para me ouvirem falar do meu trabalho, mesmo não percebendo ao certo o que faço. Por me terem trazido a calma necessária nas alturas mais difíceis. Pelo apoio incondicional e pelo carinho que toda a vida me deram. Espero continuar a ser sempre um orgulho para vocês. Dedico-vos esta Tese e tudo o que ela representa.

A todos, Obrigada!

Resumo

O impacto na saúde humana das infecções causadas por *Staphylococcus aureus*, quer no contexto hospitalar quer na comunidade, assim como o aumento do número de estirpes resistentes a múltiplos compostos antimicrobianos, tem mantido esta bactéria sob o foco de constante atenção ao longo dos anos.

A plasticidade genética desta espécie é crucial à sua sobrevivência, tendo os plasmídeos um papel fundamental na capacidade de *S. aureus* para lidar com as constantes alterações ambientais, representando uma das principais formas de transmissão de genes necessários envolvidos em diversos mecanismos de resistência e virulência.

Neste trabalho pretendeu-se determinar o papel dos plasmídeos identificados numa colecção de estirpes de *S. aureus* de origem clínica, no seu perfil de susceptibilidade a diversos compostos antimicrobianos.

Após a determinação do perfil de susceptibilidade a vários antibióticos, biocidas e metais pesados, foi realizada a extracção do DNA plasmídico das 52 estirpes estudadas e determinado o seu perfil de restrição com as enzimas *AccI* e *EcoRI*. Foram isolados plasmídeos de 43 das 52 estirpes analisadas, que se agruparam em onze perfis de restrição. Com base nestes perfis, foram seleccionadas estirpes representativas, para se proceder à cura dos respectivos plasmídeos e analisar as diferenças nos perfis de susceptibilidade das estirpes originais e curadas.

A cura dos plasmídeos pSM1, pSM11 e pSM26 originou alterações nos perfis de susceptibilidade, das respectivas estirpes, que foram depois associados à presença de determinantes plasmídicos, nomeadamente *blaZ* (resistência aos β -lactâmicos), *ermC* (resistência induzida aos macrólidos/lincosamidas/estreptograminas), *cadA* e *cadD* (diminuição de susceptibilidade ao cádmio).

Este estudo permitiu demonstrar o impacto dos determinantes plasmídicos no perfil de resistência de *S. aureus* a diferentes compostos antimicrobianos, evidenciando a sua importância na disseminação de determinantes de resistência a compostos antimicrobianos e na sobrevivência das estirpes que os transportam em ambiente hospitalar.

Abstract

The impact of *Staphylococcus aureus* infections in human health, whether hospital or community acquired, and the increasing number of strains resistant to multiple antimicrobial compounds, has kept the interest on this microorganism over the years.

This genetic plasticity of this bacterium is crucial to its survival, with plasmids playing a key role in *S. aureus* ability to cope with constant environmental challenges, being also one of the main ways of gene transmission, including genes involved in many resistance and virulence mechanisms.

The aim of this study was to determine the importance of the plasmids identified in a collection of *S. aureus* strains of clinical origin to the susceptibility profile towards several antimicrobial compounds.

After determining the susceptibility profile to different antibiotics, biocides and heavy metals, plasmids were isolated from the 52 strains in study and assigned to a restriction profile, according to their restriction pattern with enzymes *AccI* and *EcoRI*. Plasmids were isolated from 43 out of the 52 strains and grouped into eleven restriction profiles. Based on these patterns, we selected representative strains to carry the cure of the respective plasmids and evaluate the differences between the antimicrobial susceptibility profile of the original and the cured strains.

The curing of plasmids pSM1, pSM11 and pSM26 resulted in alterations of the susceptibility profiles of the respective strains, which were then associated with the presence of plasmid resistance determinants, namely *blaZ* (resistance to β -lactams, *ermC* (induced resistance to macrolides/lincosamides/streptogramins), *cadA* and *cadD* (decreased susceptibility to cadmium).

This study demonstrated the impact of plasmid determinants to the resistance profile of *S. aureus* towards antimicrobial compounds, highlighting their role in the dissemination of antimicrobial resistance determinants and in the survival of these bacteria in the nosocomial environment.

Índice Geral

Agradecimentos	ii
Resumo	iv
Abstract	v
Índice de Figuras	x
Índice de Tabelas	xii
Lista de Abreviaturas.....	xiv
1 Introdução	1
1.1 Género <i>Staphylococcus</i>	1
1.1.1 Características gerais	1
1.1.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	1
1.1.2.1 Importância clínica.....	1
1.1.2.2 Factores de virulência.....	2
1.2 Compostos antimicrobianos e mecanismos de acção	3
1.2.1 Antibióticos	3
1.2.2 Biocidas	5
1.3 Mecanismos de resistência aos compostos antimicrobianos.....	6
1.3.1 Resistência aos Antibióticos.....	7
1.3.2 Resistência aos Biocidas.....	9
1.4 A importância do genoma acessório de <i>S. aureus</i>.....	10
1.4.1 Resistência aos compostos antimicrobianos codificada por plasmídeos.....	12
1.5 Objectivos desta Tese	15
2 Material e Métodos.....	16

2.1	Material	16
2.1.1	Estirpes bacterianas	16
2.1.2	Outro material biológico.....	16
2.1.3	Meios de Cultura, enzimas e soluções.....	17
2.2	Métodos	20
2.2.1	Crescimento e manutenção das estirpes bacterianas	20
2.2.2	Testes de susceptibilidade a compostos antimicrobianos.....	20
2.2.2.1	Método de Kirby-Bauer	20
2.2.2.2	Determinação de concentrações mínimas inibitórias de compostos antimicrobianos	23
2.2.3	Análise por electroforese em gel de agarose	24
2.2.4	Extracção de DNA plasmídico	25
2.2.5	Digestão de DNA plasmídico com enzimas de restrição	26
2.2.6	Processos de cura dos plasmídeos	26
2.2.6.1	Crescimento na presença de clorpromazina	27
2.2.6.2	Crescimento na presença de concentrações crescentes de clorpromazina.....	27
2.2.7	Tipificação genética das estirpes curadas.....	28
2.2.8	Detecção da presença de genes associados às resistências aos compostos antimicrobianos identificadas	30
2.2.9	Detecção da actividade de β -lactamases.....	31
3	Resultados	32
3.1	Fenótipo de resistência aos antibióticos.....	32
3.2	Rastreio da presença de plasmídeos na colecção de estirpes clínicas em estudo.....	38
3.3	Classificação dos plasmídeos de acordo com perfis de restrição – Digestão com enzima de restrição <i>AccI</i>.....	40

3.4 Classificação dos plasmídeos de acordo com perfis de restrição – Digestão com enzima de restrição <i>EcoRI</i>.....	43
3.5 Estudo do plasmídeo pSM1	48
3.5.1 Cura do plasmídeo pSM1	48
3.5.2 Tipificação genética das estirpes curadas.....	50
3.5.3 Determinação do fenótipo de susceptibilidade a compostos antimicrobianos.....	51
3.5.3.1 Resistência aos antibióticos pelo método de Kirby-Bauer.....	51
3.5.3.2 Resistência aos metais pesados e biocidas	52
3.5.4 Detecção de produção de β -lactamases	53
3.5.5 Pesquisa dos genes <i>blaZ</i> e <i>cadD</i>	54
3.6 Estudo do plasmídeo pSM11	56
3.6.1 Cura do plasmídeo pSM11	56
3.6.2 Tipificação genética das estirpes curadas.....	57
3.6.3 Determinação do fenótipo de susceptibilidade aos compostos antimicrobianos.....	58
3.6.3.1 Resistência aos antibióticos pelo método de Kirby-Bauer.....	58
3.6.3.2 Resistência aos metais pesados e biocidas	60
3.6.4 Pesquisa do gene <i>cadA</i>	61
3.7 Estudo dos plasmídeos pSM4 e pSM26	62
3.7.1 Cura do plasmídeos pSM4 e pSM26	62
3.7.2 Tipificação genética das estirpes curadas.....	63
3.7.3 Determinação do fenótipo de susceptibilidade aos compostos antimicrobianos.....	64
3.7.3.1 Resistência aos antibióticos pelo método de Kirby-Bauer.....	64
3.7.3.2 Resistência aos metais pesados e biocidas	66
3.7.4 Amplificação por PCR dos genes <i>ermB</i> e <i>ermC</i>	67

4	Discussão e Conclusões	69
5	Referências Bibliográficas	84

Índice de Figuras

Figura 1. Aquisição de EGMs por <i>S. aureus</i>	13
Figura 2. Diferentes abordagens para a cura do plasmídeo pSM1.....	28
Figura 3. Diagrama da distribuição dos plasmídeos identificados na colecção de estirpes de <i>S. aureus</i>	39
Figura 4. Electroforese em gel de agarose de alguns dos plasmídeos extraídos.....	39
Figura 5. Perfis de restrição de DNA plasmídico com <i>AccI</i>	41
Figura 6. Electroforese em gel de agarose a dos produtos de restrição com <i>EcoRI</i> - perfil P1.....	44
Figura 7. Electroforese em gel de agarose dos produtos de restrição com <i>EcoRI</i> - perfil P1.....	44
Figura 8. Electroforese em gel de agarose dos produtos de restrição com <i>EcoRI</i> - Perfil P1, P2 e P4.....	45
Figura 9. Electroforese em gel de agarose dos produtos de restrição com <i>EcoRI</i> - Perfil P5.....	46
Figura 10. Electroforese em gel de agarose dos produtos de restrição com <i>AccI</i> e <i>EcoRI</i> - Perfis P7 e P10.....	47
Figura 11. Electroforese em gel de agarose com o resultado da extracção de DNA plasmídico de colónias isoladas após a passagem #11 de SM1 com CPZ.....	48
Figura 12. Electroforese em gel de agarose com o resultado da extracção de DNA plasmídico de colónias isoladas a partir da passagem #15 de SM1 com CPZ.....	49
Figura 13. Electroforese em gel de agarose com o resultado da extracção de DNA plasmídico de colónias isoladas a partir da passagem #11.4 de SM1.....	50

Figura 14. Análise em gel de agarose dos produtos de macro-restrição com <i>SmaI</i> por PFGE.....	51
Figura 15. Teste de produção de β -lactamases	54
Figura 16. Electroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação de um fragmento interno ao gene <i>blaZ</i> a partir de DNA plasmídico.....	55
Figura 17. Electroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação de um fragmento interno ao gene <i>cadD</i> a partir de DNA plasmídico.....	55
Figura 18. Electroforese em gel de agarose com o resultado da extracção de DNA plasmídico de colónias isoladas a partir da passagem #11 de SM11.....	57
Figura 19. Análise em gel de agarose dos produtos de macro-restrição com <i>SmaI</i> por PFGE.....	58
Figura 20. Electroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação de um fragmento interno ao gene <i>cadA</i> a partir da extracção de DNA plasmídico.....	61
Figura 21. Electroforese em gel de agarose com o resultado da extracção de DNA plasmídico de colónias isoladas a partir da passagem #11 de SM4.....	62
Figura 22. Electroforese em gel de agarose com o resultado da extracção de DNA plasmídico de colónias isoladas a partir da passagem #11 de SM26.....	63
Figura 23. Electroforese em gel de agarose dos produtos de macro-restrição com <i>SmaI</i> por PFGE.....	64
Figura 24. Ensaio da indução de resistência à Clindamicina.....	66
Figura 25. Electroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação de um fragmento interno ao gene <i>ermB</i> e <i>ermC</i>	68
Figura 26. Comparação entre perfis de restrição com <i>AccI</i>	72
Figura 27. Comparação entre perfis de restrição com <i>EcoRI</i>	72

Índice de Tabelas

Tabela 1. Mecanismos de acção das principais classes de antibióticos.....	4
Tabela 2. Mecanismos de resistência de <i>S. aureus</i> a algumas classes de antibióticos.	9
Tabela 3. Sequências nucleotídicas dos <i>primers</i> utilizados e tamanho do amplicão...	17
Tabela 4. Meios de cultura utilizados.....	18
Tabela 5. Composição e modo de preparação das soluções utilizadas.....	18
Tabela 6. Enzimas utilizadas.....	19
Tabela 7. Composição e modo de preparação de soluções de metais pesados e biocidas.....	19
Tabela 8. Lista de antibióticos utilizados no método de Kirby-Bauer e respectivos valores de halos de inibição	22
Tabela 9. Gama de concentrações de biocidas e metais pesados para a determinação de CMI's.....	24
Tabela 10. Valores de halos de inibição da estirpe ATCC25923 para diferentes antibióticos.....	32
Tabela 11. Valores de halos de inibição das estirpes estudadas para diferentes antibióticos.....	33
Tabela 12. Perfis de restrição obtidos com a enzima de restrição <i>AccI</i> e número de estirpes correspondentes.....	41
Tabela 13. Perfis de restrição obtidos com a enzima de restrição <i>EcoRI</i> e número de estirpes correspondentes.....	47
Tabela 14. Valores dos halos de inibição da estirpe SM1 não curada e das estirpes curadas para diferentes antibióticos.....	52
Tabela 15. Valores de CMI's da estirpe SM1 não curada e das respectivas estirpes curadas.....	53

Tabela 16. Valores dos halos de inibição da estirpe SM11 e da estirpe SM11-curada para os diferentes antibióticos.....	59
Tabela 17. Valores de CMIs da estirpe SM11 não curada e da estirpe curada SM11-curada.....	60
Tabela 18. Valores dos halos de inibição da estirpe SM26 não curada e da estirpe SM26-curada para os diferentes antibióticos.....	65
Tabela 19. Valor de CMIs da estirpe SM26 não curada e da estirpe SM26-curada.....	67
Tabela 20. Associação entre os perfis de restrição e o tipo clonal.....	71

Lista de Abreviaturas

ACR – Laranja de acridina

AMC – Amoxicilina-Ácido Clavulânico

AMP – Ampicilina

BAC – Cloreto de benzalcónio

BER – Berberina

CET – Cetrimida

CHL – Cloranfenicol

CHX – Diacetato de Clorexidina

CHXG – Digluconato de clorexidina

CIP – Ciprofloxacina

CLI – Clindamicina

CLSI – Do inglês *Clinical and Laboratory Standards Institute* (E.U.A)

CMI – Concentração Mínima Inibitória

CPC – Cloreto de cetilpiridínio

CPZ – Clorpromazina

CTAB – Brometo de hexadeciltrimetilamónio

CTX – Cefotaxima

DC – Cloreto de dequalínio

e.g. – Por exemplo, da locução latina *exempli gratia*

E.U.A. – Estados Unidos da América

EDTA - Do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*

EGM – Elementos Genéticos Móveis

ERY – Eritromicina

EtBr – Brometo de etídeo

EUCAST – Do inglês *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
(Suécia)

FUS – Ácido Fusídico

GEN – Gentamicina

kb – Kilobases

LZD – Linezolida

MHA – *Mueller-Hinton Agar*

MHB – *Mueller-Hinton broth*

MLS_B – Do inglês *Macrolides-Lincosamides-Streptogramines B*

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, do inglês *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*

MUP – Mupirocina

NOR – Norfloxacin

OXA – Oxacilina

pb – Pares de bases

PBP – Do inglês *Penicilin Binding Protein*

PBS – Tampão fosfato salino, do inglês *phosphate buffered saline*

PEN – Penicilina

PFGE – Electroforese em campo pulsado, do inglês *Pulsed Field Gel Electrophoresis*

PT – Pentamidina

QAC – Composto de Amônio Quaternário, do inglês *Quaternary Ammonium Compounds*

QDT – Quinupristina-Dalfopristina

QRDR – Do inglês *Quinolone Resistance–Determining Region*

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio, do inglês *sodium dodecyl sulfate*

SXT – Trimetoprim-sulfametoxazol

TAE – Tris-Acetato EDTA

TOB – Tobramicina

TPP – Brometo de tetrafenilfosfônio

TSA – Do inglês *Tryptona Soy Agar*

TSB – Do inglês *Tryptona Soy Broth*

TSST – Do inglês *Toxic Shock Syndrome Toxin*

1 Introdução

1.1 Género *Staphylococcus*

1.1.1 Características gerais

O género *Staphylococcus* pertence à família *Staphylococcaceae*, que engloba também os géneros *Jeotgalicoccus*, *Macrococcus*, *Salinicoccus* e *Gemella*, e é actualmente constituído por 48 espécies e 26 subespécies (26).

Os estafilococos são cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, imóveis, com 0,5 a 1,5 µm de diâmetro. Estas bactérias apresentam duas características importantes para o seu isolamento e distinção de outros cocos Gram-positivos: a tolerância a concentrações elevadas (10%) de cloreto de sódio e a produção de catalase (12, 34, 63). Porém, em relação à produção de catalase, as espécies de *Staphylococcus saccharolyticus* e *Staphylococcus aureus* subespécie *anaerobius* assim como algumas estirpes de *Staphylococcus aureus* subespécie *aureus* são a excepção, uma vez que não são produtoras desta enzima (34).

São várias as espécies de estafilococos que integram a flora da pele e mucosas do Homem. Entre as espécies mais comuns encontram-se *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus haemolyticus* e *Staphylococcus hominis*. Além da relação comensal entre estas bactérias e o Homem, existem espécies frequentemente associadas à ocorrência de doença nos seres humanos, em especial *S. aureus*, *S. saprophyticus* (como agentes primários de infecção) e *S. epidermidis* (como agente de infecções oportunistas) (8, 12, 63, 71).

1.1.2 *Staphylococcus aureus*

1.1.2.1 Importância clínica

S. aureus é um dos agentes bacterianos mais significativo a nível de infecções nosocomiais e adquiridas na comunidade. Além de um importante agente patogénico causador de doença nos seres humanos, esta espécie manifesta a capacidade de colonizar assintomaticamente hospedeiros saudáveis (11, 34, 60, 61). Cerca de 30-50% dos adultos são reservatório natural de *S. aureus*, 10 a 20% dos quais se encontram

colonizados de forma persistente (34, 113). Uma vez que *S. aureus* é um constituinte da flora comensal, a origem da infecção causada por esta bactéria é frequentemente endógena, nomeadamente a partir das mucosas nasais, da pele ou de uma lesão superficial que permita ao microrganismo entrar em circulação e provocar a infecção (71, 85). Por esta razão, os portadores de *S. aureus* apresentam um risco mais elevado de infecção e são considerados uma importante fonte de transmissão de estirpes entre indivíduos (11, 60).

As patologias mais comuns originadas por *S. aureus* são geralmente infecções da pele e tecidos moles, nomeadamente abscessos, celulite e impetigo, podendo também causar infecções sistémicas mais graves, como pneumonias, meningite, septicémia, endocardite e também infecções devidas à acção de toxinas, como intoxicações alimentares, síndrome da pele escaldada e síndrome de choque tóxico (8, 34, 71).

Embora as estirpes de *S. aureus* sejam habitualmente transmitidas por contacto directo, normalmente com a pele colonizada ou infectada, o contacto com objectos ou superfícies contaminadas também tem um papel importante neste processo (11, 71).

As infecções graves causadas por *S. aureus* estão muitas vezes associadas a factores relativos ao hospedeiro, nomeadamente perda da barreira natural da pele, alterações hormonais, doenças debilitantes, terapêutica à base de esteróides ou outros fármacos que comprometam a imunidade do hospedeiro, predispondo-o à ocorrência destas infecções (11, 63).

1.1.2.2 Factores de virulência

Tendo em conta que *S. aureus* é colonizador das fossas nasais, mucosas e da pele, a sua virulência só se manifesta ocasionalmente (60). As estirpes que causam doença no ser humano produzem uma grande variedade de factores de virulência, particularmente toxinas e enzimas específicas (63, 71).

Uma das principais características de *S. aureus* é a capacidade de secreção de toxinas responsáveis por causar ruptura da membrana das células do hospedeiro (85). Entre estas toxinas citolíticas conhecem-se pelo menos quatro hemolisinas (α , β , γ e δ), sendo possível uma única estirpe produzir várias destas toxinas. As hemolisinas causam a lise de glóbulos vermelhos *in vivo* e *in vitro*, a qual é observável à volta das colónias

isoladas em gelose de sangue (63, 71). Algumas estirpes de *S. aureus* também produzem a leucocidina de Panton-Valentine, uma toxina que destrói os leucócitos (63, 85). As toxinas exfoliativas, nomeadamente as toxinas epidermolíticas A e B, causam eritema da pele, sintoma observado na síndrome da pele escaldada (34, 60, 71). Algumas estirpes de *S. aureus* são responsáveis pela síndrome do choque tóxico, uma grave consequência da infecção estafilocócica, cujos sintomas resultam da actividade da enterotoxina TSST-1 (*Toxic Shock Syndrome Toxin-1*). A enterotoxina A, outro superantigénio à semelhança da TSST-1, causa intoxicação alimentar (63, 71).

Relativamente às enzimas produzidas por *S. aureus*, uma das mais importantes e característica desta espécie é a coagulase, uma enzima que converte a fibrina em fibrinogénio. O coágulo induzido pela enzima resulta na acumulação da fibrina à volta das células bacterianas, tornando difícil para as defesas do hospedeiro actuarem sobre as mesmas, impedindo assim a ocorrência de fagocitose (68). A produção desta enzima é também importante na distinção entre a espécie de *S. aureus* e a maioria das restantes espécies do género *Staphylococcus*, denominadas estafilococos coagulase negativos, embora existam outras espécies que também produzem coagulase, nomeadamente *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus delphini* e *Staphylococcus hyicus* (34).

Algumas estirpes de *S. aureus* são ainda capazes de produzir outras enzimas importantes, incluindo a hialuronidase, fibrinolisinase, lipases, ribonuclease e desoxirribonuclease (63, 71).

Outro factor de virulência importante de *S. aureus* é a presença de uma cápsula polissacárida, capaz de inibir os processos de opsonização e fagocitose das células bacterianas (71).

1.2 Compostos antimicrobianos e mecanismos de acção

1.2.1 Antibióticos

A maioria dos antibióticos existentes são produtos naturais, produzidos por diferentes espécies de microrganismos, bactérias ou fungos, que actuam como forma de defesa contra outros microrganismos que possam estar a interferir no seu microambiente. A partir destes compostos naturais bacterianos começaram a desenvolver-se novos antibióticos através da modificação parcial ou total dos originais,

por exemplo os derivados da penicilina, até à criação de compostos totalmente sintéticos, nomeadamente as fluoroquinolonas e as oxazolidinonas (110). Estes agentes antimicrobianos podem ser classificados como bactericidas ou bacteriostáticos, consoante a sua acção provoque a morte ou iniba o crescimento das bactérias, respectivamente (37, 48).

Os diferentes mecanismos de acção dos antibióticos estão sintetizados na Tabela 1.

Tabela 1. Mecanismos de acção das principais classes de antibióticos (37, 48, 110).

Mecanismo de acção	Alvo Celular	Exemplos
Inibição da síntese da parede celular	PBPs; Terminal D-Ala-D-Ala	β -lactâmicos; Glicopéptidos
Inibição da síntese proteica	Subunidade 30S e 50S do ribossoma	Aminoglicosídeos, tetraciclina, cloranfenicol, macrólidos, estreptograminas, clindamicina, linezolida
	Factor G de elongação	Ácido fusídico
Inibição da síntese de ácidos nucleicos ou de nucleótidos	DNA Girase e topoisomerase IV	Fluoroquinolonas
	RNA polimerase	Rifamicinas
	Inibição da via do ácido fólico	Trimetoprim e Sulfonamidas
Acção sobre a integridade da membrana celular	Membrana citoplasmática	Polipéptidos

PBPs: *Penicilin binding proteins*.

A síntese do peptidoglicano pode ser inibida por dois mecanismos: através da ligação irreversível do antibiótico às *penicilin-binding proteins* (PBPs) (*e.g.* penicilina, cefalosporinas), que impede o *cross-linking* das cadeias peptídicas aos glicanos, levando eventualmente à lise da bactéria; ou através da ligação do antibiótico ao péptido terminal D-Ala-D-Ala dos precursores do peptidoglicano (*e.g.* vancomicina), bloqueando as reacções de transpeptidação (110).

Relativamente à inibição da síntese proteica, existem também duas formas de acção dos antibióticos, nomeadamente através da ligação dos compostos à subunidade 30S (*e.g.* tetraciclina e aminoglicosídeos) ou à subunidade 50S do ribossoma (*e.g.*

cloranfenicol, macrólidos, clindamicina, estreptograminas e linezolida). Estas ligações causam a destabilização dos ribossomas e bloqueiam os complexos de iniciação, que por sua vez impedem a elongação das cadeias polipeptídicas (12, 48, 63). O ácido fusídico actua ao nível do factor G de elongação, impedindo a sua libertação do ribossoma e consequentemente a síntese proteica (80).

Quanto à inibição da síntese de ácidos nucleicos, existem diferentes mecanismos. No caso das fluoroquinolonas, estas interferem com os complexos formados pela DNA girase e topoisomerase IV com a dupla cadeia de DNA, impedindo a sua acção enzimática e, consequentemente, causando a inibição da replicação do DNA (41, 48, 110). As rifamicinas actuam também através da inibição da síntese de ácidos nucleicos, por intermédio da ligação à subunidade β da RNA polimerase, impedindo a síntese de mRNA (48, 107). Existem ainda agentes que interferem na via de síntese do ácido fólico (*e.g.* trimetoprim e sulfonamidas) e consequentemente na síntese de ácidos nucleicos e proteínas, uma vez que o ácido fólico é uma coenzima essencial para a síntese de purinas, timidinas e alguns aminoácidos (12, 89).

Por fim, existem ainda os antibióticos que actuam ao nível da integridade da membrana, como é o caso dos polipéptidos (*e.g.* polimixinas). Estes antibióticos intercalam-se nas membranas celulares e alteram a sua permeabilidade, levando à perda de componentes citoplasmáticos e consequentemente à lise. O seu espectro de acção está maioritariamente associado a bactérias Gram-negativas (12, 89).

1.2.2 Biocidas

Os biocidas são compostos inorgânicos ou orgânicos sintéticos que podem ser utilizados como forma de eliminar ou inibir o desenvolvimento de microrganismos patogénicos em tecidos vivos (antissépticos), em objectos e superfícies inertes (desinfectantes) e em produtos de consumo, como alimentares e cosméticos (preservantes) (32, 70). São amplamente utilizados nas unidades de saúde, fazendo parte das práticas de controlo e prevenção de infecções nosocomiais (13, 33, 70, 101).

Os antibióticos e biocidas apresentam mecanismos de acção diferentes, tendo também aplicações distintas. O principal objectivo da utilização dos biocidas é causar a morte celular num curto espaço de tempo, apresentando um espectro de acção mais

amplo e mecanismos de acção relativamente inespecíficos, sendo capazes de actuar em múltiplos alvos. Por sua vez, os antibióticos interagem de forma bastante específica com certas estruturas ou processos metabólicos da célula bacteriana (70, 73, 75).

Os biocidas podem ser divididos em quatro categorias, de acordo com os seus mecanismos de acção: (i) os agentes oxidantes (como o cloro e os peróxidos), que actuam através de reacções mediadas por radicais de forma a oxidar material orgânico; (ii) os agentes electrofílicos (incluem iões inorgânicos, como a prata e o cobre, e agentes orgânicos, como o formaldeído e a isotiazolona), que inactivam enzimas e formam radicais livres intracelulares que contribuem para a sua acção letal; (iii) os agentes catiónicos (álcoois, clorexidina, compostos de amónio quaternário - QACs), que interagem com a parede celular e afectam a sua integridade, levando rapidamente à lise e perda de constituintes essenciais às células; (iv) agentes protonóforos (ácido sórbico, ácido benzóico), que causam a disrupção da força motriz protónica e consequente inibição do transporte activo através da membrana, resultando na acidificação do meio intracelular e em alterações no metabolismo celular (13, 23, 73, 75, 92).

1.3 Mecanismos de resistência aos compostos antimicrobianos

A problemática da resistência aos compostos antimicrobianos não é um fenómeno recente, tendo surgido com a introdução dos antibióticos na prática clínica. Um exemplo disso é o facto de pouco tempo após a introdução da penicilina, terem sido isoladas estirpes resistentes a este antibiótico (11, 105). Contrariamente ao que seria desejável, o ritmo a que são produzidos e introduzidos no mercado novos antibióticos é lento comparativamente à rapidez com que emergem fenótipos de resistência. Além disso, o custo elevado da sua investigação e produção e o facto de serem direccionados a alvos mutáveis, são também entraves para a descoberta de novos agentes antimicrobianos (92, 103, 104, 105).

Uma das preocupações correntes é que o uso indiscriminado de biocidas (como forma de prevenção e disseminação de infecções) e de antibióticos (tanto na terapêutica de seres humanos e animais, como na sua inclusão na alimentação de animais para consumo humano) possa actuar como um agente de selecção de microrganismos

patogénicos resistentes a compostos antimicrobianos, potenciando a co-resistência e resistência cruzada a biocidas e antibióticos (7, 14, 70, 73, 75, 86).

1.3.1 Resistência aos Antibióticos

As bactérias são capazes de expressar resistência aos antibióticos através de diferentes mecanismos. A resistência a estes agentes pode ser inata, quando as bactérias de uma espécie apresentam características intrínsecas que as tornam resistentes aos membros de determinada classe de antibióticos (*e.g.* a existência de barreiras de permeabilidade ou ausência de alvo na bactéria), ou ser adquirida, quando populações bacterianas, que eram inicialmente susceptíveis, se tornam resistentes a um determinado agente antimicrobiano e posteriormente proliferam e dispersam sob a pressão selectiva desse agente. A resistência adquirida resulta de um modo geral da ocorrência de mutações espontâneas, da aquisição de genes localizados em elementos génicos móveis (EGMs) ou da combinação de ambos (12, 102).

Existem quatro mecanismos principais de resistência aos antibióticos: (i) modificação do alvo celular, (ii) diminuição de permeabilidade da membrana, (iii) inactivação ou modificação enzimática do antibiótico e (iv) sistemas de efluxo (22, 86, 102, 110).

O primeiro mecanismo não se foca na destruição ou remoção do alvo da acção do antibiótico mas antes na sua reprogramação ou camuflagem na célula bacteriana, isto é, através de mutações ou modificação enzimática do alvo, reduzindo a sua afinidade para o antibiótico (110). Um dos exemplos deste mecanismo é a acção das enzimas Erm (de *erythromycin ribosomal methylase*) que metilam uma adenina específica da subunidade 50S do ribossoma, reduzindo assim a sua afinidade para macrólidos, nomeadamente a eritromicina, mas também lincosamidas e estreptograminas. A resistência aos β -lactâmicos também pode dever-se a alterações do alvo celular, através do aparecimento de mutações nas PBPs (de *Penicilin Binding Proteins*) que diminuem a afinidade dos β -lactâmicos a estas proteínas (86, 102, 110).

A diminuição da permeabilidade da membrana é um mecanismo que reduz a entrada do antibiótico na célula impedindo-o desta forma de alcançar e exercer a sua

acção sobre o alvo. Outra forma de diminuição de permeabilidade é através da perda de função das porinas (12, 88).

O terceiro mecanismo baseia-se na acção de certas enzimas, como as β -lactamases ou as enzimas modificadoras dos aminoglicosídeos, cuja função é a hidrólise ou modificação do antibiótico, respectivamente, inactivando-o em ambos os casos. É dos mecanismos mais eficazes e robustos de resistência. Estas enzimas são em muitos casos codificadas por genes integrados em elementos genéticos móveis (EGMs), como plasmídeos e transposões (12, 102).

Finalmente, os sistemas de efluxo são constituídos por bombas capazes de transportar o antibiótico para o exterior da célula antes que este consiga atingir o seu alvo celular, impedindo a sua acção (88, 102). Estas bombas podem ser específicas para um determinado substrato (*e.g.* antibiótico) ou ser capazes de expulsar diferentes classes de compostos antimicrobianos, podendo neste caso estarem associadas à emergência de estirpes multirresistentes (87, 111). Diferentes estudos demonstraram que as bombas de efluxo MDR (de *multidrug resistance*) são capazes de extrusar antissépticos, solventes, metais pesados e detergentes, além de antibióticos (66). Os genes que codificam para sistemas de efluxo específicos estão normalmente associados a elementos genéticos móveis, como os plasmídeos ou transposões. Por outro lado, os sistemas de efluxo MDR encontram-se, na maioria das vezes, codificados em genes cromossómicos e são expressos de forma constitutiva ou indutiva (87).

Além dos mecanismos descritos acima, também os diferentes estados fisiológicos das células bacterianas podem influenciar a sua sobrevivência na presença de antibióticos. Entre estes estados fisiológicos destacam-se a formação de biofilmes, em superfícies, como os cateteres e outros implantes médicos, a resistência induzida por condições de crescimento reduzido e a variação fenotípica populacional (39).

Como referido anteriormente, a emergência de estirpes bacterianas resistentes e/ ou multirresistentes é cada vez mais frequente e, consequentemente, cada vez mais preocupante (84, 104). O caso de *S. aureus* é um exemplo paradigmático da emergência e disseminação de resistência a compostos antimicrobianos (Tabela 2), muito provavelmente como forma de resposta às pressões selectivas exercidas nos mais diversos ambientes (6, 14).

Tabela 2. Mecanismos de resistência de *S. aureus* a algumas classes de antibióticos (22, 61, 101).

Classe de Antibiótico	Mecanismo de resistência	Localização do gene de resistência
β -Lactâmicos	Hidrólise do anel β -lactâmico (β -lactamases); PBP extra com afinidade reduzida para o antibiótico (PBP2a)	Cromossoma, plasmídeo, transposição
Glicopéptidos	Alteração do peptidoglicano; Síntese de D-Ala-D-Lac	Cromossoma, transposição e plasmídeo
Fluoroquinolonas	Mutações na região QRDR dos genes alvo; Sistemas de efluxo	Cromossoma e plasmídeo
Aminoglicosídeos	Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos	Plasmídeo e transposição
Inibidores da via do ácido fólico	Enzimas que interferem em diferentes pontos da via do ácido fólico (reductases)	Cromossoma e plasmídeo
Oxazolidinonas	Mutações e enzimas que actuam na subunidade 50S do ribossoma	Cromossoma e plasmídeo
Macrólidos	Acetiltransferases que modificam o antibiótico; metilases de RNA que reduzem a afinidade pela subunidade ribossômica 50S	Cromossoma e plasmídeo

QRDR - *Quinolone resistance–determining region*.

1.3.2 Resistência aos Biocidas

Os casos de resistência aos biocidas têm vindo a ser documentadas desde 1952 e o seu número está aparentemente a aumentar (13, 73, 75, 86).

A resposta das células bacterianas aos biocidas é determinada essencialmente pela natureza do agente ao qual são expostas e do tipo de microrganismo envolvido, tendo em conta as suas diferenças a nível estrutural e fisiológico. A resistência aos biocidas, tal como para os antibióticos, pode ser intrínseca ou adquirida (70, 73, 75).

A resposta intrínseca aos biocidas é muito variável entre microrganismos, como por exemplo o caso das bactérias Gram-negativas e micobactérias, em que a composição da sua membrana celular externa dificulta a entrada destes compostos na célula, tornando-as por isso naturalmente menos susceptíveis a estes agentes (70, 75). Comparativamente, *S. aureus* com a sua parede celular composta essencialmente por peptidoglicano e ácido teicóico, não actuando como barreira à entrada de substâncias de elevado peso molecular, é naturalmente susceptível à acção de biocidas (70, 75).

Relativamente à resistência adquirida, esta pode ocorrer através de mutações ou aquisição de determinantes presentes em EGMs, como plasmídeos e transposões. Os principais mecanismos de resistência são caracterizados por alterações na permeabilidade da membrana celular e pelo efluxo dos compostos antimicrobianos. A inactivação do composto e alteração do alvo também estão documentados, sendo contudo casos raros e específicos para alguns biocidas, como o triclosan (13, 70, 75, 86, 91).

Actualmente, uma das maiores preocupações associadas ao uso indiscriminado de biocidas, especialmente em unidades de saúde, é a possibilidade de aparecimento de estirpes com susceptibilidade reduzida a estes compostos. Adicionalmente, uma vez que existem mecanismos de resistência, tais como os sistemas de efluxo MDR, capazes de conferir resistência a biocidas e a antibióticos, a possibilidade dos biocidas desempenharem um papel de selecção de bactérias resistentes a determinados antibióticos, é cada vez mais um tópico de debate e preocupação (70, 73, 75, 86, 92, 101). Em *S. aureus* está descrita a resistência aos β -lactâmicos (gene *blaZ*) associada à resistência aos QACs, devido à localização de determinantes de resistência a estes compostos no mesmo EGM (*e.g.* plasmídeo), possibilitando a ocorrência de co-resistência a estes compostos (1, 14, 98). Outro exemplo é o caso particular dos plasmídeos da família pSK1, que transportam determinantes de resistência a distintos agentes antimicrobianos, nomeadamente o gene *aacA-aphD*, que codifica para resistência aos aminoglicosídeos (*e.g.* gentamicina, tobramicina e canamicina), o gene *dfrA* que confere resistência ao trimetoprim, e o gene *qacA* responsável por conferir resistência aos antissépticos e desinfectantes (44).

1.4 A importância do genoma acessório de *S. aureus*

O genoma de *S. aureus* é constituído por dois grandes componentes, são eles o genoma *core*, o componente conservado e que está presente em todas as estirpes, e o genoma acessório, que representa uma parte importante da diversidade genética desta espécie (45, 56, 64).

Em *S. aureus*, o genoma *core* constitui cerca de 75% de todo o genoma e é composto por genes essenciais para o desenvolvimento e sobrevivência e por genes

responsáveis por funções comuns a esta espécie, nomeadamente genes de virulência ausentes noutras espécies de estafilococos (55, 56).

Os restantes 25% do genoma de *S. aureus* constituem o genoma acessório, podendo codificar proteínas associadas a funções não essenciais mas úteis na adaptação de estirpes aos diferentes nichos ecológicos, como factores de virulência e resistência, genes de adaptação ao hospedeiro e toxinas. O genoma acessório é constituído essencialmente por EGMs com a capacidade de se transferir horizontalmente entre estirpes (36, 45, 54, 56, 57, 64).

Estes EGMs foram descritos pela primeira vez no final de 1940 e são fragmentos de DNA que codificam vários determinantes que intervêm na sua própria transferência e integração no DNA do novo hospedeiro, para além de determinantes de resistência e virulência. A transferência horizontal destes elementos nas bactérias pode ocorrer por três mecanismos: transformação, conjugação e transdução. No entanto, *S. aureus* não apresenta na sua constituição os genes necessários aos processos de transformação (56, 64).

Face às contantes alterações ambientais e à pressão selectiva, impostas especialmente pela terapêutica antimicrobiana a que estas bactérias estão sujeitas, a capacidade para desenvolver variabilidade é crucial para a sua sobrevivência (4, 29, 43, 62). Um exemplo foi o rápido aparecimento de estirpes de *S. aureus* resistentes à penicilina poucos anos após à introdução na prática clínica deste antibiótico e cuja presença posteriormente se veio a identificar em plasmídeos (11, 62).

Aquando do início dos estudos acerca da resistência aos antibióticos pelas bactérias, assumiu-se que o seu aparecimento dever-se-ia unicamente à ocorrência de mutações e a sua posterior selecção. Contudo, nem sempre essas mutações se mostram vantajosas para as células, devido à potencial perda de *fitness*, isto é, a capacidade de sobreviver no seu ambiente natural, criação de formas menos virulentas e também devido à baixa frequência com que estas mutações ocorrem. Deste modo, a aquisição de mutações poderia não ser um processo célere o suficiente para garantir a rápida adaptação a novas condições ambientais, sendo pouco provável que este fosse o único mecanismo para a emergência de estirpes resistentes (4, 43, 62). Mais tarde, as descobertas acerca da transferência horizontal de genes demonstraram que a maioria dos casos de resistência é devida à aquisição de determinantes pré-existentes e presentes em EGMs,

nomeadamente plasmídeos, evidenciando assim a sua importância (4, 22, 29, 40, 43, 62, 96).

Em *S. aureus*, os principais EGMs correspondem a bacteriófagos, sequências de inserção, ilhas genómicas, ilhas de patogenicidade, plasmídeos, transposões e *staphylococcal cassette chromosomes* (SCC), sendo a maioria destes elementos transferida entre diferentes bactérias por transferência horizontal (54, 56, 64).

1.4.1 Resistência aos compostos antimicrobianos codificada por plasmídeos

Os plasmídeos são moléculas circulares de DNA. São elementos genéticos capazes de se replicarem independentemente do cromossoma, através de sequências específicas e proteínas regulatórias, incluindo a sua própria origem de replicação (4, 31, 64).

Os plasmídeos podem variar muito no que diz respeito ao seu tamanho, ao mecanismo de replicação e ao número e tipo de genes que transportam. Outra característica variável entre plasmídeos é o seu número de cópias dos mesmos na célula verificando-se que, de um modo geral, os plasmídeos de menores dimensões apresentam um maior número de cópias do que os plasmídeos de maiores dimensões (12, 63).

Uma vez que não codificam genes essenciais para o crescimento ou multiplicação celular, os plasmídeos são geralmente dispensáveis, podem no entanto, conferir à célula características úteis em situações ambientais específicas. Estes elementos podem transportar uma grande variedade de determinantes, associados às mais diversas funções, nomeadamente de manutenção (genes relacionados com a replicação, estabilidade e controlo de cópias), transferência, patogenicidade (*e. g.* genes de virulência), resistência a compostos antimicrobianos e de enzimas importantes na biodegradação de resíduos orgânicos (4, 31, 44).

As bactérias do género *Staphylococcus* transportam frequentemente um ou mais plasmídeos por célula, podendo estes apresentar tamanhos e conteúdos genéticos variados. Após a entrada na célula bacteriana, os plasmídeos podem permanecer sob a forma de DNA circular livre ou linearizar e integrarem-se no cromossoma (Figura 1) (64).

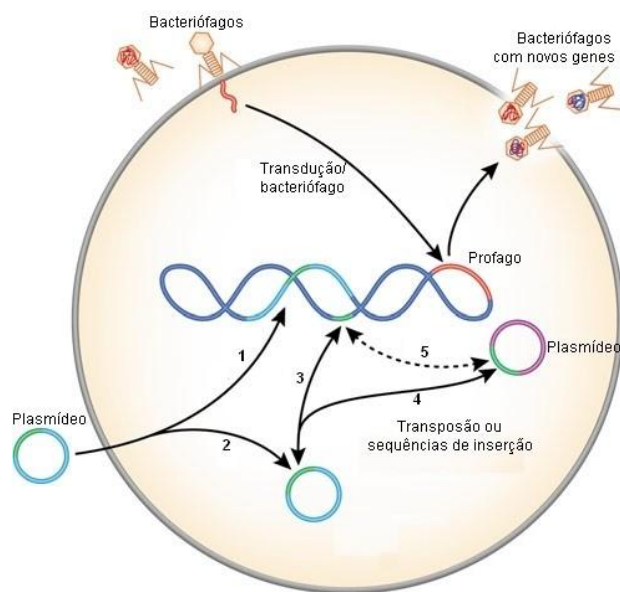


Figura 1. Aquisição de EGMs por *S. aureus*. [1] Incorporação de plasmídeos ou elementos dos mesmos no DNA genômico; [2] os plasmídeos podem ser mantidos como DNA circular livre; [3] transferência de transposão ou sequência de inserção entre o plasmídeo e o DNA genômico; [4] transferência de transposão ou sequência de inserção entre plasmídeos dentro da célula; [5] transferência de transposão ou sequência de inserção do DNA genômico para um plasmídeo. Adaptado de (64).

São muitos os plasmídeos já descritos para estafilococos, em particular para *S. aureus*. A classificação dos plasmídeos de *S. aureus* começou por ser feita com base nos chamados grupos de incompatibilidade, que agrupam plasmídeos que não podem coexistir na mesma célula por apresentarem o mesmo mecanismo de replicação (77). Posteriormente, foi criada uma classificação que agrupa os plasmídeos de *S. aureus* em três classes, de acordo com o seu tamanho e características funcionais e estruturais (82):

- Classe I: é constituída por plasmídeos de pequenas dimensões (entre 1 a 5 kb), presentes em elevado número de cópias (15 a 50 por célula). Fenotipicamente, podem ser crípticos ou transportar um determinante de resistência. A replicação destes plasmídeos ocorre por um mecanismo de círculo rolante assimétrico (do inglês *assymetric rolling circle*) através de um intermediário de cadeia simples (29, 43, 56, 62, 64). Presumivelmente em consequência das restrições de tamanho impostas por este mecanismo de replicação, é extremamente rara a presença de elementos genéticos transponíveis nestes plasmídeos (29, 43). Os plasmídeos desta classe subdividem-se

ainda em quatro famílias, com base nas semelhanças ao nível das sequências dos genes de replicação e na organização funcional: pT181, pC194, pSN2 e pE194 (5, 77).

- Classe II: agrupa os plasmídeos de tamanho intermédio, podendo atingir entre 15 e 40 kb. São plasmídeos de baixo número de cópias (entre 4 a 6 plasmídeos por célula) que se replicam através do mecanismo de replicação theta (θ). Normalmente transportam vários determinantes de resistência a diferentes compostos antimicrobianos, como os β -lactâmicos e iões inorgânicos (56, 64, 82). Os plasmídeos desta classe subdividem-se em duas famílias, a pSK1 e a família dos plasmídeos de resistência β -lactamase/metais pesados, que codificam a resistência aos β -lactâmicos através do gene *blaZ* (localizado no transposão Tn552), aos iões inorgânicos arsenato, mercúrio e cádmio, através dos respectivos operões *ars*, *mer* e *cad* e a compostos antissépticos, através dos determinantes *qacA* ou *qacB* (29, 30, 44, 82).

- Classe III: engloba os plasmídeos de maiores dimensões identificados até à data (40 a 60 kb). Estes plasmídeos apresentam semelhanças aos da classe anterior no que diz respeito à multirresistência e ao mecanismo de replicação, distinguindo-se no entanto por serem capazes de mediar a sua própria transferência por conjugação, uma vez que codificam mecanismos de transferência horizontal através dos genes *tra* ou *trs*, e a mobilização de plasmídeos mais pequenos (5, 29, 30, 58). Esta classe é tipificada por um conjunto de plasmídeos estruturalmente relacionados entre si: pSK41, pGO1 e pJE1. Os plasmídeos desta família podem conferir resistência (i) aos aminoglicosídeos (gentamicina, tobromicina e canamicina), devido à presença do híbrido Tn4001-IS257, no qual está presente o determinante *aacA-aphD*, ou de uma cópia integrada do plasmídeo da classe I pBU110, na qual está presente o determinante *aadD*; (ii) aos antissépticos e desinfetantes, através da bomba de efluxo codificada pelo gene *smr*; (iii) ao trimetoprim, devido ao gene *drfA* presente no elemento Tn4003; (iv) à penicilina graças a elementos do tipo Tn552; e finalmente (v) à mupirocina, devido à presença do gene *mupA* (ou *ileS2*) que confere alto nível de resistência (5, 58, 82, 83).

Mais recentemente, foram desenvolvidos novos sistemas de classificação destes elementos, nomeadamente a classificação baseada na homologia dos genes de iniciação da replicação, os genes *rep* (31, 42, 69). Utilizando esta classificação, McCarthy *et al.* (2012) agruparam 243 plasmídeos de *S. aureus*, com sequências completas disponíveis

em bases de dados públicas, em 39 grupos com base na combinação de genes *rep*, presentes em cada plasmídeo (69). Porém, este tipo de classificação, apesar de bastante fiável, exige uma análise detalhada de sequências nucleotídicas nem sempre acessível. Desenvolveram-se também outras abordagens mais práticas do ponto de vista experimental, nomeadamente através da análise de perfis de restrição que permitem uma análise e caracterização preliminar dos plasmídeos, especialmente com grau elevado de semelhança, uma vez que a presença de pequenas deleções ou mutações nos locais de restrição podem alterar os perfis obtidos (42, 96).

1.5 Objectivos desta Tese

O sucesso de *S. aureus* como agente patogénico e comensal deve-se, em parte, à sua versatilidade para se adaptar às mudanças e múltiplas pressões selectivas exercidas pelo ambiente em que se encontra. Os plasmídeos são importantes formas de transmissão de genes associados a diferentes mecanismos de resistência aos antimicrobianos e factores de virulência, essenciais para a sobrevivência destas bactérias em contexto hospitalar.

Esta tese teve como principal objectivo estudar a importância destes elementos genéticos móveis no desenvolvimento de resistência a diferentes compostos antimicrobianos. Para isso, estudou-se o perfil e distribuição de um conjunto de plasmídeos isolados de uma colecção de estirpes de *S. aureus* de origem hospitalar, procurando-se estabelecer correlações entre os determinantes que codificam e os fenótipos de resistências diversos compostos antimicrobianos observados para estas estirpes.

2 Material e Métodos

2.1 Material

2.1.1 Estirpes bacterianas

Para o estudo da presença de determinantes plasmídicos associados à resistência a compostos antimicrobianos foi analisada uma colecção de 52 estirpes de *S. aureus* isoladas no laboratório de Bacteriologia de um hospital de Lisboa, entre Dezembro de 2006 e Março de 2007. Destas estirpes, que correspondem a 50 MRSA e duas estirpes MSSA, 51 apresentam resistência à ciprofloxacina (19, 27).

Foi também utilizada ao longo do trabalho como referência a estirpe *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach ATCC25923, originalmente isolada em 1945 a partir de uma amostra clínica em Seattle, E.U.A.

2.1.2 Outro material biológico

Na análise dos produtos de extracção de DNA plasmídico por electroforese em gel de agarose, foram utilizados os marcadores 1 kb DNA Ladder GeneRuler™ e DNA λ HindIII (Fermentas, Vilnius, Lituânia) e na análise dos produtos de PCR (do inglês *Polimerase Chain Reaction*) foi utilizado o marcador 100bp DNA Ladder Plus GeneRuler™ (Fermentas).

Para os ensaios de electroforese em gel de campo pulsado (PFGE, do inglês *Pulse Field Gel Electrophoresis*) utilizou-se o marcador lambda Ladder PFG (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, E.U.A.).

Nas reacções de PCR utilizaram-se ainda os *primers* descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Sequências nucleotídicas dos *primers* utilizados neste trabalho e tamanho do amplicão.

<i>Primer</i>	Sequência nucleotídica (5' - 3')	Tamanho do amplicão (pb)	Referência
blaZ_Fw	GATAAGAGATTTGCCTATGC	533	74
blaZ_Rv	GCATATGTTATTGCTTGACC		
cadA_Fw	CCAAAGCGGTAGATGACGAA	553	Este estudo
cadA_Rv	GCAAGTGGATGTTGTGAACG		
cadD_Fw	GGTGTATTATGATTCAAACGGT	614	Este estudo
cadD_Rv	TCCTAAAATTGTTTGAATAGTG		
ermB_Fw	TGGAACAGGTAAAGGGCATT	433	Este estudo
ermB_Rv	TGTGGTATGGCGGGTAAGTT		
ermC_Fw	TCGTAAC TGCCATTGAAATA	348	Este estudo
ermC_Rv	TCACTTTAGGTTTAGGATGAAA		

pb: pares de bases; FW: *forward*; Rv: *reverse*.

2.1.3 Meios de Cultura, enzimas e soluções

A composição e o modo de preparação dos meios de cultura, soluções e enzimas utilizadas durante o trabalho experimental, encontram-se descritos nas Tabelas 4 a 7. Todos os meios de cultura e soluções foram preparadas com água bidestilada e, quando necessário, esterilizadas por autoclavagem a 121°C durante 15 minutos, à exceção da solução *stock* de glicerol (Sigma-Aldrich, St. Louis, E.U.A) a 50% (v/v), que foi autoclavada a 110°C também durante 15 minutos.

Tabela 4. Meios de cultura utilizados.

Meio de Cultura ⁽¹⁾	Composição (por litro)
Tryptone Soya Agar (TSA)	15 g Peptona de caseína; 3,0 g Peptona de soja; 5,0 g NaCl; 15,0 g Agar; pH 7,3±0,2 a 25°C
Tryptone Soya Broth (TSB)	17,0 g Peptona de caseína; 3,0 g Peptona de soja; 5,0 g NaCl; 2,5 g K ₂ HPO ₄ ; 2,5 g Glucose; pH 7,3±0,2 a 25°C
Mueller-Hinton Agar (MHA)	300 g Infusão desidratada de carne; 17,5 g Caseína hidrolisada; 1,5 g Amido; 17,0 g Agar; pH 7,3±0,1 a 25°C
Mueller-Hinton Broth (MHB)	300 g Infusão desidratada de carne; 17,5 g de Caseína hidrolisada; 1,5 g Amido; 4,347 mg Ca ²⁺ ; 6,206 mg Mg ²⁺ ; pH 7,3 ± 0,1 a 25°C
Mueller-Hinton Broth (MHB) pH 5,5	MHB, com pH ajustado a 5,5 por adição de HCl

(1) Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra

Tabela 5. Composição e modo de preparação das soluções utilizadas.

Solução	Composição
TAE 1X	40 mM Tris-acetato ⁽¹⁾ ; 1 mM EDTA ⁽¹⁾ , pH 8,0; Solução stock a 50X
Soro Fisiológico	0,9 g de NaCl ⁽²⁾ ; 100 ml H ₂ O bidestilada
Tampão P1 (Minilysate Solution I)	0,05 M Tris-base ⁽¹⁾ ; 0,01 M Na ₄ EDTA.H ₂ O ⁽¹⁾ ; pH 8,0
Tampão P2 (Minilysate Solution II)	0,2M NaOH ⁽¹⁾ ; 1% (p/v) SDS ⁽¹⁾
Tampão P3 (Minilysate Solution III)	3M Acetato de Sódio ⁽²⁾ (C ₂ H ₃ NaO ₂) pH 4,8
PIV	10 mM Tris pH 8,0; 1,0 M NaCl ⁽²⁾
Solução EC	6 mM Tris pH 8,0; 100 mM EDTA ⁽¹⁾ pH 8,0; 0,2% (p/v) Deoxicolato de sódio ⁽¹⁾ ; 0,5% (p/v) Laurilsarcosina de sódio ⁽³⁾ ; 0,05 mg/ml RNase ⁽¹⁾ ; 0,1 mg/ml Lisozima ⁽¹⁾ ; 0,05 mg/ml Lisostafina ⁽¹⁾
Solução ESP	0,25 M EDTA ⁽¹⁾ pH 9,0; 1% (p/v) Laurilsarcosina de sódio ⁽³⁾ ; 1 mg/ml Proteinase K ⁽¹⁾
TE 1X	10 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0
TBE 0,5X⁽⁴⁾	1 M Tris-base; 1 M ácido bórico; 20 mM EDTA; pH 8,3 Solução “stock” a 10X

(1) Sigma-Aldrich, St. Louis, E.U.A.; (2) Panreac Quimica SA, Barcelona, Espanha; (3) USB Corporation, Cleveland, Ohio, E.U.A.; (4) Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, E.U.A.

Tabela 6. Enzimas utilizadas.

Enzima ⁽¹⁾	Composição da solução <i>stock</i>
Lisostafina	15 mg/ml em H ₂ O bidestilada estéril; mantida em alíquotas a -20°C
RNaseA	10 mg/ml em H ₂ O bidestilada estéril; mantida em alíquotas a -20°C
Lisozima	
Proteinase K	

(1) Sigma-Aldrich.

Tabela 7. Composição e modo de preparação de soluções de metais pesados e biocidas.

Solução		Composição/Preparação da solução <i>stock</i>
Metais Pesados	ZnCl ₂ ⁽¹⁾	1792 mM em água bidestilada estéril Mantida à temperatura ambiente
	Cd(CH ₃ COO) ₂ ⁽¹⁾	
	AgNO ₃ ⁽²⁾	896 mM em água bidestilada estéril Mantida à temperatura ambiente
	CuSO ₄ ⁽²⁾	
Biocidas	Pentamidina (PT) ⁽¹⁾	20 mg/ml em água bidestilada estéril Mantida a -20°C
	Berberina (BER) ⁽¹⁾	10 mg/ml em 100% Dimetilsulfóxido ⁽²⁾ (DMSO) Diluições em água bidestilada estéril Mantida a 4°C
	Brometo de etídeo (EtBr) ⁽¹⁾	10 mg/ml em água bidestilada estéril ^(*) Mantida ao abrigo da luz e a 4°C
	Laranja de Acridina (ACR) ⁽¹⁾	10 mg/ml em água bidestilada estéril Mantida a 4°C
	Cetrimida (CET) ⁽¹⁾	1 mg/ml em água bidestilada estéril Mantida a -20°C
	Cloreto de cetilpiridínio (CPC) ⁽¹⁾	10 mg/ml em água bidestilada estéril Mantida a -20°C
	Brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB) ⁽³⁾	1 mg/ml em água bidestilada estéril Mantida a -20°C
	Cloreto de benzalcônio (BAC) ⁽¹⁾	1 mg/ml em água bidestilada estéril Mantida a -20°C
	Brometo de tetrafenilfosfônio (TPP) ⁽¹⁾	12 mg/ml em água bidestilada estéril ^(*) Mantida a -20°C
	Clorexidina (CHX) ⁽¹⁾	1 mg/ml em água bidestilada estéril Mantida a -20°C
	Digluconato de clorexidina (CHXG) ⁽¹⁾	1% (p/v) em água bidestilada estéril Mantida a -20°C
	Cloreto de dequalínio (DC) ⁽¹⁾	4 mg/ml em água bidestilada estéril Mantida a -20°C

(1) Sigma-Aldrich; (2) Merck, Darmstadt, Alemanha; (3) Fluka Chemie GmbH, Buchs, Suíça; (*) necessário aquecimento para dissolução completa.

2.2 Métodos

2.2.1 Crescimento e manutenção das estirpes bacterianas

Durante este trabalho, todas as estirpes foram cultivadas a 37°C em *Tryptone Soya Agar* (TSA) ou *Tryptone Soya Broth* (TSB) (com agitação) consoante as necessidades dos protocolos. Para a realização de ensaios de susceptibilidade aos antibióticos pelo método de Kirby-Bauer, as estirpes foram inoculadas em *Mueller-Hinton Agar* (MHA).

Foram mantidos *stocks* das culturas a -80°C em meio líquido (TSB), suplementado com 10% (v/v) de glicerol (Sigma-Aldrich).

2.2.2 Testes de susceptibilidade a compostos antimicrobianos

2.2.2.1 Método de Kirby-Bauer

A determinação dos fenótipos de susceptibilidade aos antibióticos foi realizada através do método de Kirby-Bauer e a interpretação dos resultados foi feita com base nos valores de *breakpoint* padronizados pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, Wayne, E.U.A.) (17). Para o ácido fusídico, foram utilizados os valores padronizados pelo EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, Växjö, Suécia) (25). Para estes ensaios foram seleccionados antibióticos representativos de diferentes classes (Tabela 8), para os quais existe informação acerca de resistência associada a determinantes plasmídicos. Na selecção dos antibióticos foi também tido em conta aqueles utilizados na realização do antibiograma no laboratório hospitalar onde foram isoladas as estirpes.

Para a realização do método de Kirby-Bauer preparou-se o inóculo, a partir de culturas puras frescas, ressuspendendo-se colónias isoladas em 10 ml de soro fisiológico estéril. A suspensão foi homogeneizada por agitação e ajustada a uma turbidez equivalente a 0,5 da escala de McFarland (BioMérieux, Marcy l'Etoile, França). A suspensão foi inoculada em placas de MHA com auxílio de zaragatoa, tendo-se deixado secar durante 5 minutos, após os quais foram colocados os discos de antibióticos sobre o inóculo.

Quinze minutos após a aplicação dos discos, as placas foram invertidas e incubadas a 37°C. Após 18 horas de incubação foram medidos e registrados os halos de inibição dos diferentes antibióticos, com exceção da oxacilina e mupirocina, cuja leitura foi feita após 24 horas de incubação.

De forma a identificar estirpes com fenótipo de resistência induzida aos macrólidos, lincosamidas e estreptograminas do tipo B - MLS_B (*Macrolides-Lincosamides-type B Streptogramins*), foi realizado o teste de resistência induzida à clindamicina (“D-teste”). Este teste consiste em colocar os discos de eritromicina e clindamicina a uma distância de 15 a 26 mm um do outro (17). Quando a resistência à clindamicina é induzida ocorre uma deformação do seu halo de inibição, adjacente ao disco de eritromicina, observando-se uma zona com a forma de “D” (17, 28, 52).

Estes ensaios foram realizados em triplicado para cada estirpe e composto.

Tabela 8. Lista de antibióticos utilizados nos ensaios pelo método de Kirby-Bauer e respectivos valores de halos de inibição, padronizados pela CLSI para *breakpoint* (17), excepto no caso do ácido fusídico, para o qual se consideraram os valores do EUCAST (25).

Antibiótico ⁽¹⁾	Classe	Carga disco (µg)	<i>Breakpoint</i> de halo de inibição (mm)		
			Resistente	Intermédio	Sensível
Oxacilina	β-lactâmicos	1	≤ 10	11 – 12	≥ 13
Ampicilina		10	≤ 28	----	≥ 29
Amoxicilina-Ácido Clavulânico ⁽²⁾		30	≤ 19	----	≥ 20
Penicilina		10 U	≤ 28	----	≥ 29
Cefotaxima		30	≤ 14	15 – 22	≥ 23
Norfloxacin	Fluoroquinolonas	10	≤ 12	13 – 16	≥ 17
Ciprofloxacina		5	≤ 15	16 – 20	≥ 21
Gentamicina	Aminoglicosídeos	10	≤ 12	13 – 14	≥ 15
Tobramicina		10	≤ 12	13 – 14	≥ 15
Eritromicina	Macrólido	15	≤ 13	14 – 22	≥ 23
Clindamicina	Lincosamidas	2	≤ 14	15 – 20	≥ 21
Quinupristina-Dalfopristina ⁽³⁾	Estreptograminas	15	≤ 15	16 – 18	≥ 19
Trimetoprim-sulfametoxazol ⁽⁴⁾	Inibidor da via dos folatos	25	≤ 10	11 – 15	≥ 16
Tetraciclina	Tetraciclina	30	≤ 14	15 – 18	≥ 19
Linezolida	Oxazolidinona	30	≤ 20	----	≥ 21
Cloranfenicol	Fenicol	30	≤ 12	13 – 17	≥ 18
Mupirocina	----	200	Presença de halo: ausência resistência de alto nível		
Ácido fusídico	-----	10	< 24	----	≥ 24

(1) Oxoid Ltd.; (2) Combinação de β-lactâmico com inibidor de β-lactamase; (3) Combinação de duas estreptograminas; (4) Combinação entre trimetoprim e sulfonamida.

2.2.2.2 Determinação de concentrações mínimas inibitórias de compostos antimicrobianos

Além do método de Kirby-Bauer, utilizado para a determinação do fenótipo de susceptibilidade aos antibióticos, foi também realizada a determinação das concentrações mínimas inibitórias (CMI) de outros compostos antimicrobianos, nomeadamente biocidas e metais pesados.

As CMIs foram determinadas através do método de microdiluição em meio líquido (MHB) em placas de 96 poços (Carl-Roth, Karlsruhe, Alemanha), segundo as normas do CLSI (17). A CMI é definida como a menor concentração de um composto antimicrobiano capaz de inibir o crescimento visível de um dado microrganismo.

Prepararam-se culturas em 5 ml de meio MHB, durante a noite, a 37°C e com agitação. Em cada poço da placa adicionaram-se 100 µl de meio MHB. De seguida, foi adicionado ao primeiro poço 100 µl do composto a testar em MHB, sendo realizadas diluições seriadas (diluições 1:2) do mesmo. Por fim, foi adicionado ao meio suplementado com o composto, 100 µl de inóculo (cultura crescida durante a noite diluída 1:1000 em MHB). As placas foram incubadas a 37°C durante 18 horas, após as quais foi avaliada visualmente a presença ou ausência de crescimento em cada concentração testada. Para a determinação da CMI do ZnCl₂, seguiu-se o protocolo descrito anteriormente, com a excepção do meio utilizado nas placas, na preparação do composto e do inóculo, visto ser necessário utilizar meio MHB com um valor de pH 5,5. A determinação das CMIs foi realizada em triplicado para cada estirpe e composto.

Os compostos antimicrobianos testados (biocidas e metais pesados) e as gamas de concentrações testadas para cada um estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9. Gama de concentrações de biocidas e metais pesados testadas para a determinação de CMIs.

	Composto	Gama de concentrações
Metais pesados	ZnCl ₂	0 a 2 mM
	Cd(CH ₃ COO) ₂	0 a 4 mM
	AgNO ₃	0 a 16 mM
	CuSO ₄	0 a 8 mM
Biocidas	PT	0 a 128 µg/ml
	BER	0 a 1024 µg/ml
	EtBr	0 a 64 µg/ml
	ACR	0 a 512 µg/ml
	CET	0 a 32 µg/ml
	CPC	0 a 8 µg/ml
	CTAB	0 a 32 µg/ml
	BAC	0 a 16 µg/ml
	TPP	0 a 256 µg/ml
	CHX	0 a 8 µg/ml
	CHXG	0 a 0,01 % (p/v)
	DC	0 a 32 µg/ml

PT: Pentamidina; BER: Berberina; EtBr: Brometo de etídeo; ACR: Laranja de acridina; CET: Cetrimida; CPC: Cloreto de cetilpiridínio; CTAB: Brometo de hexadeciltrimetilamónio; BAC: Cloreto de benzalcónio; TPP: Brometo de tetrafenilfosfónio; CHX: Diacetato de Clorexidina; CHXG: Digluconato de clorexidina; DC: Cloreto de dequalínio.

2.2.3 Análise por electroforese em gel de agarose

A análise do DNA plasmídico e dos perfis de restrição foi feita através de electroforese em gel de agarose a 1% (p/v) em tampão TAE 1X, sujeitas a 80V durante 1 hora e 30 minutos. Utilizou-se o sistema Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad Laboratories, Inc.) e fonte de alimentação Amersham Pharmacia Biotech EPS 301 (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). Após a migração, os géis foram corados numa solução de brometo de etídeo (1 µg/ml) durante 15 minutos e descorados em água bidestilada durante 10 minutos. Os resultados foram observados e registados no aparelho Gel-doc XR (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

2.2.4 Extracção de DNA plasmídico

A extracção do DNA plasmídico começou por ser realizada utilizando um sistema comercial (“Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega, Madison, WI, E.U.A.). No entanto, o rendimento da extracção não foi o desejado e por essa razão optou-se pelo protocolo de extracção “Minilysate”, baseado no método da lise alcalina (94) e que inclui um passo de lise mecânica, seguido de um passo de lise enzimática das células bacterianas.

O primeiro passo consistiu na obtenção de um sedimento bacteriano por centrifugação a 7.000 rpm (Biofuge Pico Heraeus, Buckinghamshire, Inglaterra) de 1,5 ml de cultura crescida durante a noite. De seguida ressuspendeu-se o sedimento em tampão P1 (“Minilysate Solution I”), suplementado com RNase A (para uma concentração final de 0,1 mg/ml), utilizando-se uma agitação vigorosa para facilitar a ressuspensão do sedimento celular e iniciar a lise das células – lise mecânica. Por se tratar de *S. aureus*, foi adicionada lisostafina (para uma concentração final de 0,3 mg/ml) e as amostras incubadas a 37°C durante 15 minutos. Após este período, foi adicionado o tampão P2 (“Minilysate Solution II” - solução de lise) – lise enzimática – homogeneizando por inversão, até o lisado ficar mais translúcido e viscoso, sendo depois incubado em gelo durante 5 minutos. De seguida foi adicionado o tampão P3 (“Minilysate Solution III”) e o lisado foi incubado em gelo durante 10 minutos e depois centrifugado a 13.000 rpm. O sobrenadante obtido foi transferido para um novo tubo contendo etanol absoluto gelado (Panreac Quimica SA, Barcelona, Espanha), de forma a precipitar o DNA plasmídico presente. Após uma hora de incubação à temperatura ambiente, foi feita nova centrifugação a 13.000 rpm. Após desprezado o sobrenadante, foi feita uma lavagem do DNA plasmídico, ressuspendendo-se o mesmo em etanol a 80% gelado, tendo sido novamente centrifugado a 13.000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e secou-se o DNA plasmídico obtido durante 15 minutos a 37°C. Finalmente, o DNA plasmídico foi ressuspendido em H₂O Mili-Q e conservado a -20°C até ser utilizado.

O DNA plasmídico obtido foi analisado por electroforese em gel de agarose, conforme descrito no ponto 2.2.3.

2.2.5 Digestão de DNA plasmídico com enzimas de restrição

De modo a obter um padrão de restrição dos plasmídeos presentes nas diferentes estirpes, cada amostra de DNA plasmídico extraído foi sujeita à acção da enzima de restrição *AccI* (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, E.U.A.) (96) através da incubação de 20 µl de DNA plasmídico com 10 U de *AccI* a 37°C, durante 1 hora e 30 minutos.

Além da digestão com *AccI*, os plasmídeos foram também sujeitos à digestão com *EcoRI* de forma a confirmar o agrupamento obtido com a restrição com *AccI*. Para tal, digeriram-se 20 µl de cada amostra de DNA plasmídico com 15 U de *EcoRI* (Fermentas) a 37°C durante 1 hora e 30 minutos.

Os produtos obtidos após cada restrição foram analisados em gel de agarose, em conjunto com o plasmídeo não digerido correspondente, da forma descrita no ponto 2.2.3.

Além da digestão realizada experimentalmente, foi também realizada a digestão *in silico* com estas duas enzimas. Para tal, foi utilizada a ferramenta *online* NEBcutter V2.0, através da qual é possível obter uma série de informações acerca de uma sequência nucleotídica, nomeadamente mapas de enzimas de restrição, digestões *in silico* e ligação à base de dados das enzimas de restrição (109). Por intermédio desta ferramenta, foi possível obter as figuras correspondentes aos possíveis géis de electroforese após a restrição de determinadas sequências nucleotídicas. Assim, seleccionaram-se as mesmas condições utilizadas para aqueles obtidos durante este trabalho, nomeadamente gel de agarose a 1% e marcador 1 kb, para que fosse possível a comparação dos perfis de restrição obtidos.

2.2.6 Processos de cura dos plasmídeos

O processo de cura dos plasmídeos foi realizado através de passagens sucessivas das estirpes SM1, SM4, SM11 e SM26 em meio líquido (TSB), na presença de concentrações crescentes de clorpromazina (CPZ) (Sigma-Aldrich) (20). Os valores das concentrações foram escolhidos com base no valor de CMI de CPZ para as quatro estirpes, correspondendo a valores sub-inibitórios deste composto, neste caso inferiores a metade da CMI (2 a 22 mg/L) (19).

2.2.6.1 Crescimento na presença de clorpromazina

A partir das culturas mantidas em *stock*, inoculou-se uma placa de TSA com cada uma das estirpes SM1, SM4, SM11 e SM26 de forma a obter colónias puras e frescas para se iniciar o processo de cura dos plasmídeos. Após 16-18 horas de incubação, inocularam-se 2 colónias de cada estirpe em 5 ml de TSB a 37° C, com agitação, durante 16-18 horas, sendo esta a **passagem #0**. De cada uma das culturas obtidas após crescimento durante a noite, transferiram-se 50 µl (1% v/v) para um novo tubo com 5 ml de TSB suplementado com 2 mg/L de CPZ (**passagem #1**); posteriormente foram feitas passagens diárias para TSB suplementado com CPZ, com aumentos sucessivos de 2 mg/L, até a uma concentração final de 22 mg/L de CPZ (**passagem #11**). Todas as culturas foram incubadas a 37° C, com agitação e durante 16-18 horas (Figura 2).

Terminado o protocolo da cura de plasmídeos e de forma a verificar se este tinha sido bem-sucedido, foram realizadas diluições seriadas em PBS da cultura correspondente à última passagem (**passagem #11**). As diluições 10^{-7} a 10^{-12} foram plaqueadas em TSA, em triplicado e incubadas a 37°C durante a noite. Após a incubação, foram selecionadas colónias isoladas e procedeu-se à extracção do DNA plasmídico, conforme o ponto 2.2.4, de maneira a verificar a sua ausência e assim confirmar se a cura teria sido bem sucedida. A escolha das colónias foi aleatória, visto não se conhecer à partida nenhum marcador, associado ao plasmídeo em causa, capaz de distinguir as colónias curadas das não curadas.

As estirpes potencialmente curadas (ausência de plasmídeo) foram testadas para sensibilidade aos antibióticos, biocidas e metais pesados através do método de Kirby-Bauer e determinação de CMI's como descrito nos pontos 2.2.2.1 e 2.2.2.2.

2.2.6.2 Crescimento na presença de concentrações crescentes de clorpromazina

Para além da abordagem anterior, foram também testadas outras duas em paralelo com objectivo de curar o plasmídeo pSM1, já que tal não foi alcançado com o primeiro protocolo de cura (Figura 2).

Uma dessas abordagens consistiu na realização de passagens sucessivas da estirpe SM1 em TSB suplementado com CPZ ultrapassando metade do valor da CMI. Assim, foram realizadas passagens diárias da estirpe SM1 em TSB suplementado com CPZ,

com incrementos sucessivos de 2 mg/L até à **passagem #15**, correspondente a uma concentração de 30 mg/L de CPZ. De seguida procedeu-se da mesma forma descrita no ponto anterior para obter colónias isoladas e consequente extracção de DNA plasmídico, para avaliar o processo da cura.

A segunda abordagem consistiu em submeter as culturas a passagens sucessivas com a mesma concentração de CPZ, nomeadamente de 22 mg/L. Deste modo, seguiu-se o protocolo descrito no ponto 2.2.6.1. e a partir da última passagem (**passagem #11**) a cultura foi transferida para meio fresco, tendo-se adicionado a mesma concentração de CPZ (22 mg/L). Ao todo, foram realizadas quatro passagens adicionais da cultura com esta concentração de CPZ (passagens denominadas de **#11.1**, **#11.2**, **#11.3** e **#11.4**). Posteriormente, procedeu-se como já descrito para obtenção de colónias isoladas e a extracção de DNA plasmídico a fim de avaliar o processo da cura.

As estirpes potencialmente curadas foram testadas para a sensibilidade aos antibióticos, biocidas e metais pesados através do método de Kirby-Bauer e determinação de CMI's como descrito nos pontos 2.2.2.1 e 2.2.2.2.

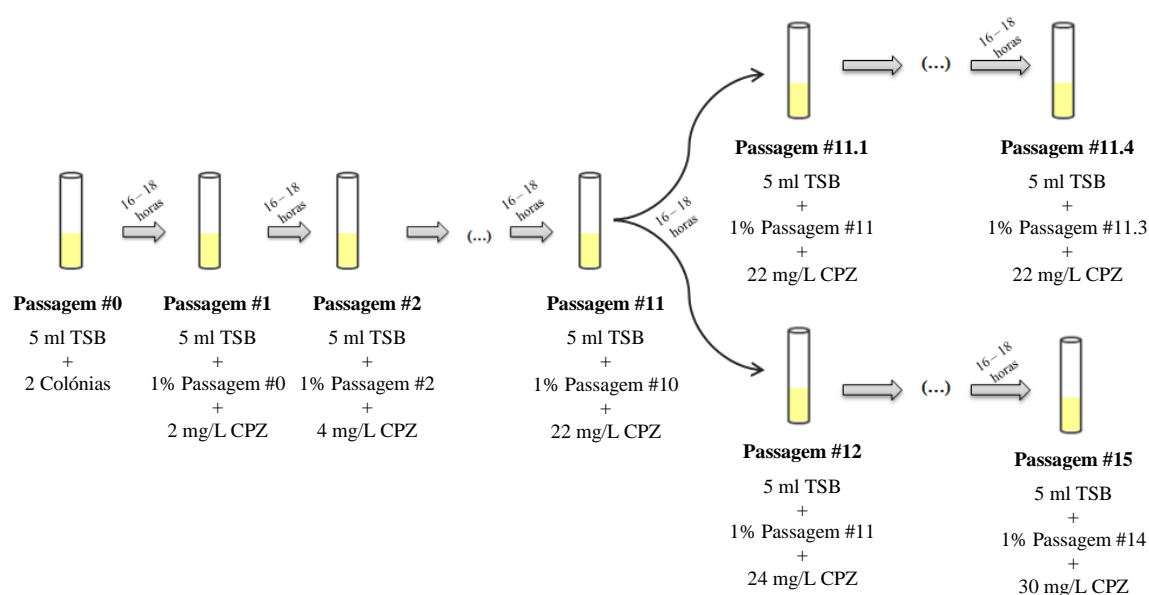


Figura 2. Diferentes abordagens para cura do plasmídeo pSM1.

2.2.7 Tipificação genética das estirpes curadas

De maneira a garantir que não ocorreu contaminação durante os processos de cura, as estirpes potencialmente curadas de plasmídeos e as estirpes originais correspondentes

foram sujeitas a tipificação genética através da análise dos perfis de macro-restrição com *Sma*I (New England Biolabs Inc.) por PFGE (16).

A partir de placas de isolamento de cada estirpe (inicial e curada), inoculou-se uma colônia em 5 ml de TSB, incubando-se a 37°C com agitação, durante 16 a 18 horas. Após esse período recolheram-se as células por centrifugação, a 13.000 rpm durante 5 minutos e ressuspendeu-se o sedimento em tampão PIV. Depois de nova centrifugação e ressuspensão em PIV, ajustou-se a concentração celular a uma densidade óptica a 620 nm (DO_{620nm}) a 0,5 da suspensão em tampão PIV e equilibrou-se a 42°C. De seguida, misturou-se a suspensão celular com igual volume de agarose tipo VII “low gelling temperature” (Sigma-Aldrich) 1,5% (p/v), em tampão PIV, pré-aquecida a 42°C. Desta suspensão foram preparados discos, de 20 µl cada. Estes foram depois colocados a -20°C durante 5 minutos e depois 10 minutos à temperatura ambiente. De seguida, os discos foram colocados em solução de lise EC e incubados a 37°C durante 5 horas. Seguiu-se o tratamento com solução ESP a 50°C durante a noite. No dia seguinte, decantou-se a solução ESP e procedeu-se às lavagens dos discos com tampão TE 1X (cinco lavagens de 30 minutos cada), de forma a remover a proteinase K e todos os restos celulares. Os discos de DNA obtidos foram mantidos em 1 ml de tampão TE 1X a 4°C até serem utilizados (16).

Para a análise dos perfis de macro-restrição, foi escolhido um disco de DNA de cada estirpe para realizar a digestão do mesmo com a enzima de restrição *Sma*I (New England Biolabs Inc.) (20U/disco), durante a noite a 25-28°C. Após a digestão, colocaram-se os discos num gel de agarose SeaKem LE (Lonza, Rockland, Reino Unido) a 1% (p/v) e o perfil de macro-restrição foi obtido por corrida de PFGE, durante 23 horas com pulsos iniciais de 5 segundos e pulsos finais de 35 segundos, a 200 V, num aparelho CHEF-DRIII (Bio-Rad Laboratories, Inc.) (16).

Após a corrida, o gel foi corado numa solução de EtBr (0,5 µg/ml) durante meia hora, descorado em água destilada durante 45 min e fotografado num aparelho Gel-doc XR (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, E.U.A.).

2.2.8 Detecção da presença de genes associados às resistências aos compostos antimicrobianos identificadas

A presença ou ausência dos genes *blaZ*, *cadA*, *cadD*, *ermB* e *ermC* foi analisada através da amplificação de fragmentos internos destes genes por reacções de PCR. Os *primers* utilizados encontram-se descritos na Tabela 3. As reacções de PCR foram realizadas num termociclador UNO II (Biometra[®], Goettingen, Alemanha).

Para a reacção de amplificação dos fragmentos de *ermB*, *ermC* e *cadD* foi preparada uma mistura de reacção de 47,5 µl composta por 1X tampão *Taq* (Fermentas), 2 U de *Taq* Polimerase (Fermentas), 20 pmol de cada *primer*, 200 µM de cada dNTP (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra) e 1,75 mM de MgCl₂ (Fermentas). Na amplificação do fragmento de *blaZ* preparou-se uma mistura de reacção semelhante, no entanto a concentração de MgCl₂ foi de 2,5 mM e 40 µM de cada dNTP. À mistura de reacção foram adicionados 2,5 µl de DNA plasmídico.

A amplificação do fragmento do gene *blaZ* foi realizada nas seguintes condições: desnaturação a 94°C durante 4 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 segundos, amplificação a 55°C durante 30 segundos e extensão 72°C por 1 minuto e um passo de extensão final a 72°C durante 10 minutos (74).

Para a amplificação do fragmento do gene *cadA* foi preparada uma mistura de reacção em tudo semelhante à realizada para a amplificação de *ermB*, *ermC* e *cadD*, com a excepção da concentração dos *primers*, que neste caso foi de 25 pmol de cada. Para a amplificação, o programa utilizado consistiu num passo de 4 minutos de desnaturação a 94°C, seguido da sua amplificação durante 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 1 minuto, emparelhamento a 52°C durante um minuto e extensão a 72°C durante 1 minuto, seguido de extensão final durante 10 minutos a 72°C.

O programa de amplificação do fragmento de *cadD* foi muito semelhante ao utilizado para a amplificação de *cadA*, sendo composto por 3 minutos de desnaturação do DNA a 95°C, seguido da sua amplificação durante 30 ciclos de desnaturação a 95°C durante 1 minuto, emparelhamento a 48°C durante um minuto e extensão a 72°C durante 1 minuto, e a extensão final durante 5 minutos a 72°C.

Finalmente, para a amplificação dos fragmentos dos genes *ermB* e *ermC*, o programa utilizado consistiu em 3 minutos de desnaturação do DNA a 94°C, seguindo-se a amplificação durante 30 ciclos de desnaturação, a 94°C durante 30 segundos,

emparelhamento, durante 30 segundos a 55°C para *ermB* e 48°C para *ermC*, e extensão a 72°C durante 30 segundos, e um passo de extensão final a 72°C durante 5 minutos.

Para todas as reacções foi preparado um controlo negativo, em que o volume de DNA foi substituído por água bidestilada estéril.

Os produtos de amplificação foram analisados por electroforese em gel de agarose conforme descrito no ponto 2.2.3.

2.2.9 Detecção da actividade de β -lactamases

De forma a testar a presença de β -lactamases nas estirpes originais e nas curadas, foi utilizado o teste da nitrocefina “BD BBL™ DrySlide™ Nitrocefin” (Beckton, Dickson and Company, Sparks, NV, E.U.A.). Este é um teste qualitativo que detecta a produção de β -lactamases pelas bactérias, por intermédio da nitrocefina, uma cefalosporina cromogénica. A reacção baseia-se na produção de um composto corado quando a nitrocefina (substrato) é exposta à bactéria produtora da β -lactamase. Esta, se presente, provoca a hidrólise do anel β -lactâmico da nitrocefina, o que origina a mudança de cor de amarelo para rosa.

O teste foi realizado conforme as recomendações do fabricante. Resumidamente, hidratou-se com uma gota de água destilada estéril as áreas do cartão BBL DrySlide™ a utilizar. De seguida, foi recolhida com uma ansa uma colónia isolada de cada estirpe a testar e fez-se um esfregaço numa das zonas de reacção do cartão. Finalmente, aguardou-se entre 5 minutos a uma hora, de forma a verificar a mudança ou não de cor na zona onde foi feito o esfregaço. Como controlo negativo do teste foi utilizada a estirpe de referência *S. aureus* ATCC 25923 e como controlo positivo a estirpe SM39, anteriormente caracterizada e que se sabe possuir β -lactamase (76).

No caso de um resultado negativo, repetiu-se o procedimento para as estirpes induzidas com um antibiótico da classe dos β -lactâmicos, neste caso a penicilina. Para isso, retiraram-se colónias periféricas à zona do halo de inibição de um disco de penicilina (10 U) de uma placa MHA, preparada de acordo com as recomendações para o teste de susceptibilidade por Kirby-Bauer e repetiu-se o teste da nitrocefina, conforme descrito acima.

3 Resultados

3.1 Fenótipo de resistência aos antibióticos

A caracterização fenotípica da resistência aos antibióticos foi realizada para a estirpe ATCC25923, que serviu de controlo, e para as 52 estirpes da colecção através do método de Kirby-Bauer. A selecção dos antibióticos baseou-se no antibiograma habitualmente realizado para esta bactéria e o facto de poder existir uma associação entre a resistência a estes compostos e determinantes plasmídicos. Os valores dos halos de inibição obtidos para a estirpe de referência e as estirpes clínicas encontram-se descritos nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 10. Valores de halos de inibição (em mm) da estirpe de referência ATCC25923 para diferentes antibióticos^[A].

ATCC25923		
Antibiótico	Halo	Fenótipo
OXA	20	S
AMP	30	S
AMC	24	S
PEN	34	S
CTX	25	S
NOR	28	S
CIP	30	S
GEN	28	S
TOB	25	S
ERY	30	S
CLI	23	S
QDT	30	S
SXT	34	S
TET	30	S
LZD	32	S
CHL	28	S
MUP	35	AHLR
FUS	30	S

[A] Valores padronizados pelo CLSI (17) e EUCAST (apenas para o ácido fusídico) (25) para *breakpoint*. OXA: oxacilina; AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina-ácido clavulânico; PEN: penicilina; CTX: cefotaxima; NOR: norfloxacin; CIP: ciprofloxacina; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina; ERY: eritromicina; CLI: clindamicina; QDT: Quinopristina/Dalfopristina; SXT: trimetoprim-sulfametoxazol; TET: tetraciclina; LZD: linezolida; CHL: cloranfenicol; MUP: mupirocina; FUS: ácido fusídico. S: sensível; I: intermédio; R: resistente; AHLR: ausência de resistência de alto nível.

Tabela 11. Valores de halos de inibição (mm) das estirpes estudadas para diferentes antibióticos^[A].

Estirpes	Antibióticos																	
	OXA		AMP		AMC		PEN		CTX		NOR		CIP		GEN		TOB	
	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo
SM1	6	R	11	R	11	R	10	R	6	R	6	R	6	R	24	S	6	R
SM2	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R
SM3	6	R	9	R	6	R	11	R	6	R	6	R	6	R	30	S	28	S
SM4	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	8	R	22	S	24	S
SM5	6	R	6	R	16	R	6	R	6	R	6	R	6	R	25	S	25	S
SM6	6	R	9	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	25	S	24	S
SM7	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	26	S	21	S
SM8	6	R	13	R	6	R	15	R	10	R	6	R	6	R	24	S	25	S
SM9	6	R	9	R	6	R	6	R	10	R	9	R	6	R	23	S	23	S
SM10	6	R	6	R	20	S	6	R	6	R	6	R	6	R	22	S	6	R
SM11	6	R	6	R	6	R	8	R	6	R	6	R	6	R	22	S	25	S
SM12	6	R	6	R	19	R	6	R	6	R	6	R	6	R	26	S	27	S
SM13	6	R	6	R	20	S	6	R	6	R	6	R	6	R	24	S	26	S
SM14	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	25	S	6	R
SM15	22	S	29	S	25	S	40	S	34	S	15	I	20	I	8	R	12	R
SM16	21	S	6	R	21	S	14	R	6	R	6	R	6	R	21	S	24	S
SM17	6	R	6	R	18	R	6	R	6	R	6	R	6	R	24	S	6	R
SM18	6	R	6	R	10	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R
SM19	6	R	10	R	6	R	13	R	18	I	6	R	6	R	26	S	21	S
SM20	6	R	11	R	23	S	16	R	18	I	6	R	6	R	26	S	26	S
SM21	6	R	10	R	18	R	13	R	13	R	6	R	6	R	26	S	25	S
SM22	6	R	6	R	6	R	10	R	6	R	6	R	6	R	24	S	6	R
SM23	6	R	9	R	20	R	14	R	13	R	6	R	6	R	24	S	26	S
SM24	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	26	S	26	S
SM25	6	R	6	R	19	R	10	R	12	R	6	R	6	R	21	S	6	R
SM26	6	R	6	R	6	R	14	R	6	R	6	R	6	R	22	S	26	S
SM27	6	R	6	R	16	R	9	R	9	R	6	R	6	R	21	S	6	R

[A] Valores padronizados pelo CLSI (17) para *breakpoint*. OXA: oxacilina; AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina-ácido clavulânico; PEN: penicilina; CTX: cefotaxima; NOR: norfloxacin; CIP: ciprofloxacina; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina. S: sensível; I: intermédio; R: resistente.

Tabela 11. (continuação)^[A]

Estirpes	Antibióticos																	
	OXA		AMP		AMC		PEN		CTX		NOR		CIP		GEN		TOB	
	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo
SM28	6	R	9	R	20	S	13	R	13	R	6	R	6	R	22	S	22	S
SM29	6	R	6	R	14	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R
SM30	6	R	6	R	17	R	9	R	13	R	6	R	6	R	22	S	23	S
SM31	6	R	6	R	6	R	10	R	8	R	6	R	6	R	24	S	6	R
SM32	20	S	30	S	28	S	44	S	26	S	12	R	18	I	19	S	28	S
SM33	6	R	6	R	11	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R
SM34	18	S	16	R	30	S	21	R	33	S	6	R	6	R	6	R	6	R
SM35	6	R	6	R	18	R	8	R	6	R	6	R	6	R	25	S	25	S
SM36	6	R	6	R	18	R	8	R	6	R	6	R	6	R	24	S	27	S
SM37	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R
SM38	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	28	S	25	S
SM39	11	I	6	R	22	S	6	R	18	I	28	S	30	S	28	S	6	R
SM40	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	22	S	22	S
SM41	6	R	6	R	6	R	10	R	6	R	6	R	6	R	21	S	24	S
SM42	6	R	6	R	6	R	9	R	6	R	6	R	6	R	24	S	25	S
SM43	6	R	6	R	18	R	10	R	14	R	6	R	6	R	25	S	6	R
SM44	6	R	6	R	6	R	13	R	10	R	6	R	6	R	24	S	6	R
SM45	6	R	10	R	6	R	15	R	11	R	6	R	6	R	26	S	23	S
SM46	6	R	6	R	17	R	10	R	12	R	6	R	6	R	24	S	6	R
SM47	6	R	6	R	18	R	11	R	12	R	6	R	6	R	25	S	6	R
SM48	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	25	S	6	R
SM49	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	24	S	28	S
SM50	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R
SM51	6	R	6	R	14	R	8	R	6	R	6	R	6	R	25	S	28	S
SM53	6	R	6	R	14	R	9	R	6	R	6	R	6	R	25	S	25	S

[A] Valores padronizados pelo CLSI (17) para *breakpoint*. OXA: oxacilina; AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina-ácido clavulânico; PEN: penicilina; CTX: cefotaxima; NOR: norfloxacin; CIP: ciprofloxacina; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina. S: sensível; I: intermédio; R: resistente.

Tabela 11. (continuação)^[A]

Estirpes	Antibióticos																	
	ERY		CLI		QDT		SXT		TET		LZD		CHL		MUP		FUS	
	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo
SM1	6	R	6	R	29	S	38	S	34	S	34	S	27	S	43	AHLR	32	S
SM2	6	R	6	R	29	S	6	R	11	R	36	S	26	S	40	AHLR	36	S
SM3	6	R	32(D)	R ⁽¹⁾	30	S	40	S	35	S	38	S	20	S	40	AHLR	35	S
SM4	6	R	30(D)	R ⁽¹⁾	25	S	32	S	28	S	33	S	26	S	31	AHLR	32	S
SM5	6	R	32(D)	R ⁽¹⁾	26	S	32	S	30	S	35	S	21	S	36	AHLR	28	S
SM6	6	R	32(D)	R ⁽¹⁾	27	S	30	S	32	S	32	S	25	S	38	AHLR	30	S
SM7	6	R	36(D)	R ⁽¹⁾	24	S	31	S	28	S	30	S	24	S	32	AHLR	30	S
SM8	6	R	6	R	24	S	32	S	30	S	33	S	28	S	40	AHLR	34	S
SM9	9	R	34	S	28	S	22	S	25	S	27	S	19	S	33	AHLR	38	S
SM10	6	R	32(D)	R ⁽¹⁾	26	S	32	S	30	S	33	S	25	S	40	AHLR	32	S
SM11	30	S	33	S	28	S	40	S	26	S	30	S	24	S	37	AHLR	30	S
SM12	6	R	34(D)	R ⁽¹⁾	26	S	31	S	32	S	37	S	26	S	37	AHLR	34	S
SM13	30	S	28	S	36	S	30	S	29	S	30	S	28	S	38	AHLR	32	S
SM14	6	R	6	R	19	S	35	S	28	S	31	S	29	S	35	AHLR	26	S
SM15	6	R	6	R	27	S	30	S	24	S	33	S	24	S	39	AHLR	34	S
SM16	30	S	31	S	28	S	33	S	28	S	30	S	25	S	39	AHLR	32	S
SM17	10	R	32(D)	R ⁽¹⁾	27	S	34	S	32	S	32	S	26	S	40	AHLR	34	S
SM18	6	R	6	R	29	S	6	R	10	R	36	S	28	S	41	AHLR	36	S
SM19	6	R	40(D)	R ⁽¹⁾	30	S	36	S	35	S	32	S	26	S	40	AHLR	38	S
SM20	6	R	34(D)	R ⁽¹⁾	26	S	30	S	31	S	34	S	26	S	40	AHLR	34	S
SM21	6	R	32(D)	R ⁽¹⁾	27	S	32	S	32	S	34	S	26	S	40	AHLR	36	S
SM22	6	R	6	R	26	S	36	S	28	S	32	S	25	S	38	AHLR	31	S
SM23	30	S	34	S	29	S	36	S	32	S	36	S	29	S	42	AHLR	32	S
SM24	6	R	36(D)	R ⁽¹⁾	28	S	32	S	30	S	34	S	27	S	36	AHLR	36	S
SM25	6	R	38(D)	R ⁽¹⁾	25	S	30	S	28	S	32	S	25	S	37	AHLR	30	S
SM26	6	R	40(D)	R ⁽¹⁾	30	S	32	S	30	S	30	S	25	S	40	AHLR	32	S

[A] Valores padronizados pelo CLSI (17) e EUCAST (apenas para o ácido fusídico) (25) para *breakpoint*. ERY: eritromicina; CLI: clindamicina; QDT: Quinopristina/Dalfopristina; SXT: trimetoprim-sulfametoxazol; TET: tetraciclina; LZD: linezolida; CHL: cloranfenicol; MUP: mupirocina; FUS: ácido fusídico. S: sensível; I: intermédio; R: resistente; AHLR: ausência de resistência de alto nível. (D): Halo em forma de D; (1): resistência induzida.

Tabela 11. (continuação)^[A]

Estirpes	Antibióticos																	
	ERY		CLI		QDT		SXT		TET		LZD		CHL		MUP		FUS	
	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo
SM27	6	R	6	R	25	S	32	S	28	S	31	S	24	S	37	AHLR	28	S
SM28	6	R	34(D)	R ⁽¹⁾	25	S	30	S	28	S	30	S	25	S	33	AHLR	31	S
SM29	6	R	6	R	26	S	6	R	10	R	36	S	26	S	38	AHLR	36	S
SM30	6	R	36(D)	R ⁽¹⁾	25	S	32	S	26	S	30	S	26	S	32	AHLR	30	S
SM31	6	R	6	R	28	S	32	S	30	S	33	S	26	S	48	AHLR	32	S
SM32	26	S	35	S	32	S	29	S	34	S	28	S	24	S	42	AHLR	25	S
SM33	6	R	6	R	30	S	6	R	13	R	40	S	30	S	41	AHLR	13	R
SM34	12	R	15(D)	R ⁽¹⁾	30	S	6	R	16	I	36	S	31	S	40	AHLR	30	S
SM35	6	R	32(D)	R ⁽¹⁾	28	S	34	S	32	S	34	S	28	S	40	AHLR	34	S
SM36	6	R	34(D)	R ⁽¹⁾	28	S	34	S	30	S	34	S	27	S	37	AHLR	36	S
SM37	6	R	6	R	30	S	6	R	13	R	32	S	26	S	44	AHLR	34	S
SM38	6	R	34(D)	R ⁽¹⁾	27	S	40	S	32	S	36	S	28	S	35	AHLR	38	S
SM39	6	R	6	R	27	S	34	S	29	S	34	S	26	S	40	AHLR	36	S
SM40	6	R	38(D)	R ⁽¹⁾	30	S	38	S	34	S	36	S	28	S	33	AHLR	36	S
SM41	6	R	36(D)	R ⁽¹⁾	28	S	28	S	30	S	30	S	24	S	38	AHLR	30	S
SM42	6	R	36(D)	R ⁽¹⁾	28	S	36	S	30	S	32	S	30	S	33	AHLR	34	S
SM43	6	R	40(D)	R ⁽¹⁾	28	S	36	S	32	S	34	S	26	S	42	AHLR	32	S
SM44	28	S	30	S	29	S	34	S	30	S	34	S	28	S	40	AHLR	30	S
SM45	6	R	34	S	29	S	38	S	30	S	36	S	28	S	36	AHLR	15	R
SM46	6	R	30(D)	R ⁽¹⁾	30	S	34	S	34	S	30	S	28	S	40	AHLR	30	S
SM47	6	R	6	R	29	S	36	S	34	S	36	S	28	S	40	AHLR	32	S
SM48	6	R	6	R	26	S	36	S	30	S	32	S	28	S	38	AHLR	28	S
SM49	6	R	44(D)	R ⁽¹⁾	30	S	39	S	28	S	38	S	26	S	39	AHLR	30	S
SM50	6	R	6	R	26	S	6	R	15	I	38	S	28	S	35	AHLR	34	S
SM51	10	R	30(D)	R ⁽¹⁾	30	S	35	S	33	S	34	S	28	S	37	AHLR	35	S
SM53	6	R	30(D)	R ⁽¹⁾	30	S	38	S	32	S	34	S	26	S	40	AHLR	33	S

[A] Valores padronizados pelo CLSI (17) e EUCAST (apenas para o ácido fusídico) (25) para *breakpoint*. ERY: eritromicina; CLI: clindamicina; QDT: Quinopristina/Dalfopristina; SXT: trimetoprim-sulfametoxazol; TET: tetraciclina; LZD: linezolida; CHL: cloranfenicol; MUP: mupirocina; FUS: ácido fusídico. S: sensível; I: intermédio; R: resistente; AHLR: ausência de resistência de alto nível. (D): Halo em forma de D; (1): resistência induzida.

Os valores obtidos para a estirpe de referência estão de acordo com os descritos pelo CLSI e EUCAST (para o ácido fusídico) para esta estirpe (17, 25).

Quanto às estirpes clínicas, observaram-se diferentes perfis de susceptibilidade ao conjunto de antibióticos testados (Tabela 11).

Relativamente aos β -lactâmicos, existem apenas três estirpes MSSA (SM15, SM32 e SM39), uma vez que não apresentam resistência a todos os antibióticos testados desta classe. A estirpe SM16 apesar de ser sensível à oxacilina e à amoxicilina-ácido clavulânico apresenta o gene *mecA* sendo por isso uma estirpe MRSA (S. S. Costa, comunicação pessoal).

Verificou-se que a grande maioria das estirpes mostrou ser resistente à ciprofloxacina e norfloxacina, como esperado tendo sido este o critério para a selecção destas estirpes. No entanto, verificou-se uma discrepância face ao resultado do antibiograma realizado pelo laboratório hospitalar, visto que a estirpe SM39 é sensível à acção das fluoroquinolonas testadas.

Quanto aos aminoglicosídeos testados, cerca de metade das estirpes eram resistentes à tobramicina mas somente oito apresentam resistência à gentamicina.

No que diz respeito ao macrólido eritromicina, a maioria das estirpes aparenta ser resistente a este antibiótico e somente as estirpes SM11, SM13, SM16, SM23, SM32 e SM44 são susceptíveis à sua acção. Nas estirpes resistentes foi aplicado o “D-teste” para identificar o tipo de fenótipo de resistência MLS_B , se constitutivo ou induzido. A aplicação deste teste, permitiu concluir que em 27 estirpes a resistência à clindamicina é induzida pela eritromicina (“D-teste” positivo), em dezasseis estirpes a resistência é constitutiva (“D-teste” negativo) e nove estirpes são sensíveis à clindamicina e por isso não apresentam o fenótipo MLS_B .

No caso da tetraciclina e do trimetoprim-sulfametoxazol, apenas sete das estirpes em estudo apresentam resistência a estes antibióticos. Verifica-se ainda que o conjunto de estirpes resistentes ao primeiro antibiótico coincide com aquele resistente ao segundo.

Relativamente à mupirocina, pretendeu-se identificar se alguma das estirpes apresentava um alto nível de resistência a este agente, isto porque a presença do determinante associado a este fenótipo foi descrita em plasmídeos de *S. aureus* (15, 95). Segundo os critérios do CLSI, considera-se que uma estirpe apresenta um alto nível de resistência à mupirocina quando não se observa halo de inibição em redor do disco. A presença de qualquer halo de inibição, independentemente do seu diâmetro, corresponde

à ausência deste fenótipo (17). Tendo em conta que se observou um halo de inibição superior a 30 mm para todas as estirpes, nenhuma foi classificada com este fenótipo de resistência.

Já para o ácido fusídico, cujo fenótipo foi avaliado segundo as normas da EUCAST (25), apenas se detectou resistência para duas estirpes (SM33 e SM45).

Nenhuma das estirpes estudadas é resistente à acção da linezolida, do cloranfenicol ou da quinipristina/daflopristina.

3.2 Rastreio da presença de plasmídeos na colecção de estirpes clínicas em estudo

Para a análise da presença de determinantes plasmídicos associados à resistência a antibióticos na colecção das 52 estirpes de *S. aureus* em estudo, foi necessário proceder-se à detecção de DNA plasmídico. Assim, foi possível identificar a presença de plasmídeos em 43 das 52 estirpes estudadas (82,7 %).

Das 43 estirpes para as quais se observou a presença de plasmídeo, a maioria (25 estirpes) tem um só plasmídeo enquanto as restantes 18 têm dois. Das 25 estirpes em que se identificou apenas um plasmídeo, 16 têm um plasmídeo de grandes dimensões (≥ 23 kb) e nove têm um plasmídeo pequeno (≤ 6 kb). Relativamente às 18 estirpes com dois plasmídeos, 16 têm um plasmídeo de grandes dimensões e um de pequenas dimensões, uma estirpe tem dois plasmídeos de grandes dimensões enquanto outra tem dois plasmídeos de pequenas dimensões (Figura 3). Deste modo, no total, identificaram-se 61 plasmídeos nas 43 estirpes.

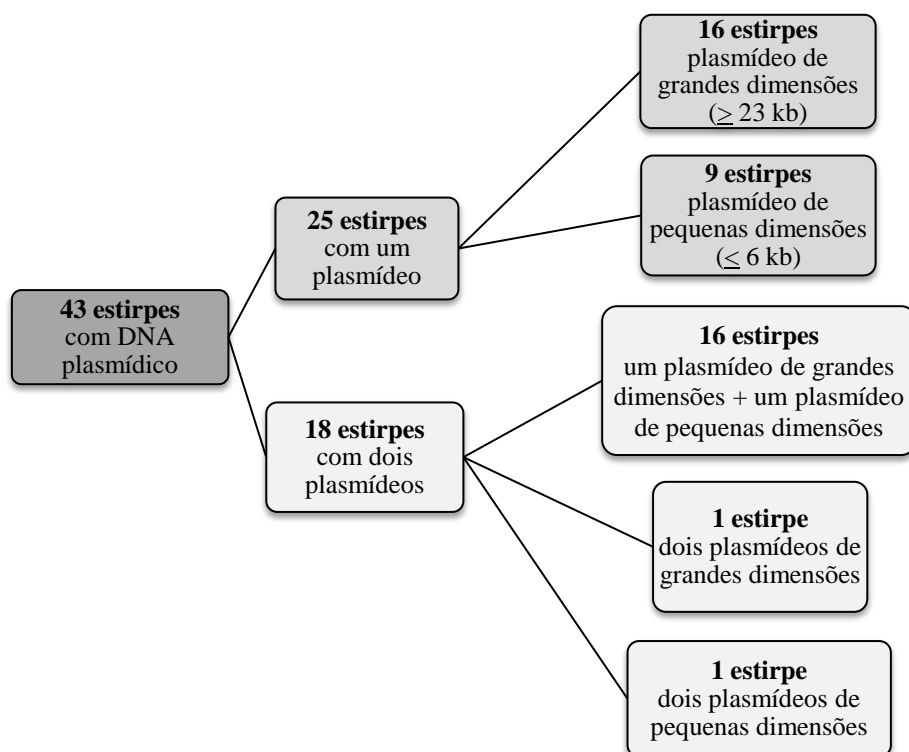


Figura 3. Diagrama da distribuição dos plasmídeos identificados na colecção de estirpes de *S. aureus* (n=52).

Na Figura 4 apresentam-se exemplos de alguns dos plasmídeos extraídos.

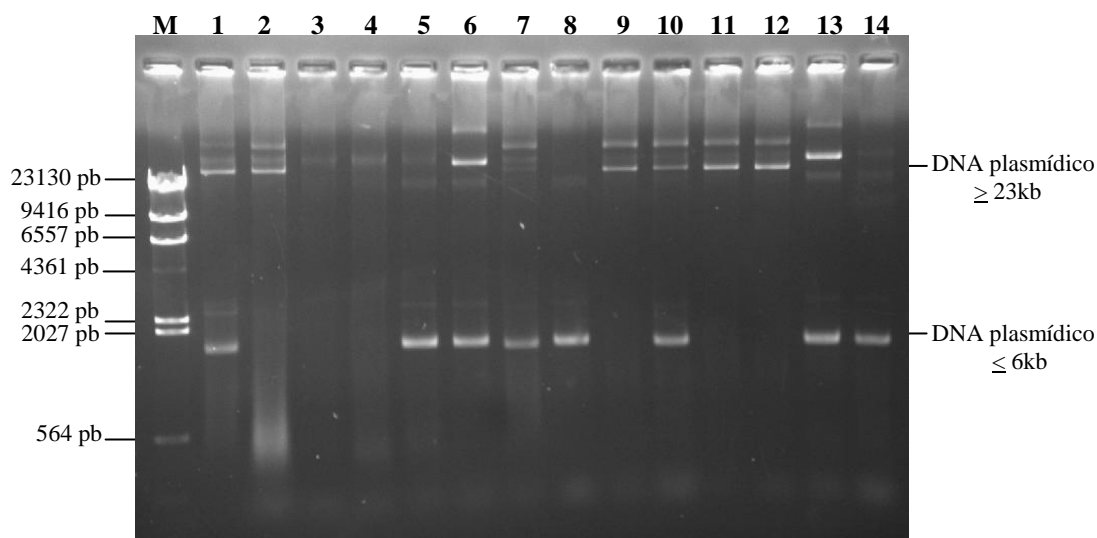


Figura 4. Electroforese em gel de agarose a 1% de alguns dos plasmídeos extraídos com o protocolo "Minilysate". M: Marcador DNA λ HindIII; DNA plasmídico obtido das estirpes: 1: SM21; 2: SM23; 3: SM33; 4: SM34; 5: SM35; 6: SM36; 7: SM41; 8: SM42; 9: SM43; 10: SM45; 11: SM46; 12: SM47; 13: SM51; 14: SM53.

3.3 Classificação dos plasmídeos de acordo com perfis de restrição – Digestão com enzima de restrição *AccI*

Dado terem sido identificados plasmídeos em 43 estirpes, estas foram estudadas com o objectivo de determinar o número de plasmídeos presentes em cada estirpe, o seu tamanho e perfil de restrição.

Para isso, os plasmídeos isolados foram sujeitos à digestão com a enzima *AccI*, tendo sido atribuído a cada plasmídeo (ou conjunto de plasmídeos, no caso das estirpes com mais do que um plasmídeo) um perfil de restrição, de acordo com o padrão de bandas obtido. A escolha desta enzima teve como base o protocolo utilizado por Shearer *et al.* (2011) (96), que teve em conta o facto de uma enzima de corte pouco frequente, não originando um número muito elevado de fragmentos.

Seguindo esta metodologia, foi possível agrupar os diferentes plasmídeos em onze perfis de restrição, que se encontram descritos na Tabela 12.

Em primeiro lugar foram digeridos os plasmídeos de grandes dimensões, isto é, aqueles que apresentavam uma banda superior a 23 kb, tendo sido identificados três perfis de restrição: P1, P2 e P5. O tamanho destes plasmídeos varia entre, aproximadamente, 19,4 e 28,2 kb. Seguiu-se a digestão dos plasmídeos pequenos (plasmídeos que apresentavam uma banda ≤ 6 kb), tendo sido agrupados em apenas dois perfis, P7 e P10, com tamanhos semelhantes – 2,1 e 2,6 kb respectivamente. Aparentemente estes plasmídeos linearizaram após a digestão. O tamanho dos plasmídeos foi calculado através da soma dos tamanhos dos fragmentos obtidos da digestão, com base no marcador de pesos moleculares 1 kb DNA Ladder GeneRuler™. Finalmente, foi feita a digestão do DNA plasmídico das estirpes com mais do que um plasmídeo, tendo sido identificados seis perfis diferentes (P3, P4, P6, P8, P9 e P11).

Tabela 12. Perfis de restrição obtidos com a enzima *AccI* e número de estirpes correspondentes.

Perfil de Restrição	Número de plasmídeos	Tamanho (kb) ^(a)	Número de estirpes	Estirpes
P1	1	19,4	12	SM1, SM10, SM14, SM16, SM17, SM22, SM27, SM31, SM43, SM46, SM47, SM48
P2	1	24,2	2	SM11, SM13
P3	2	— ^(b)	6	SM8, SM19, SM20, SM21, SM41, SM45
P4	2	— ^(b)	2	SM25, SM23 ^(c)
P5	1	28,2	1	SM39
P6	2	— ^(b)	1	SM3
P7	1	2,1	8	SM4, SM5, SM6, SM9, SM35, SM38, SM42, SM53
P8	2	— ^(b)	8	SM7, SM12, SM24, SM30, SM36, SM40, SM49, SM51
P9	2	— ^(b)	1	SM15
P10	1	2,6	1	SM26
P11	2	— ^(b)	1	SM28

(a) Ver em conjunto com a Tabela 13; (b) Tamanho não determinado dada a presença de mais do que um plasmídeo;

(c) Posteriormente agrupado no perfil P1, de acordo com a restrição com *EcoRI*.

Na Figura 5 são apresentados exemplos de todos os perfis de restrição obtidos após a digestão com a enzima *AccI*, em conjunto com o plasmídeo respectivo.

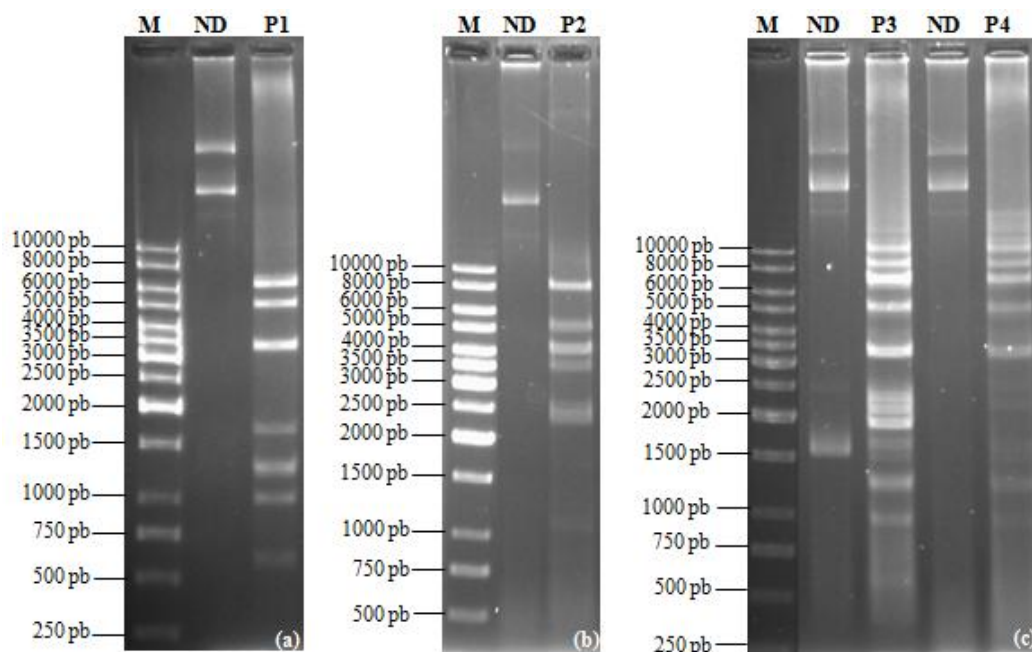


Figura 5. Perfis de restrição de DNA plasmídico com *AccI*. Os perfis foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%. (a) Perfil P1; (b) Perfil P2; (c) Perfil P3 e Perfil P4. M: 1 kb DNA Ladder GeneRuler™. ND: Plasmídeo não digerido. P1 a P4: Perfis plasmídicos obtidos após digestão com enzima *AccI*.

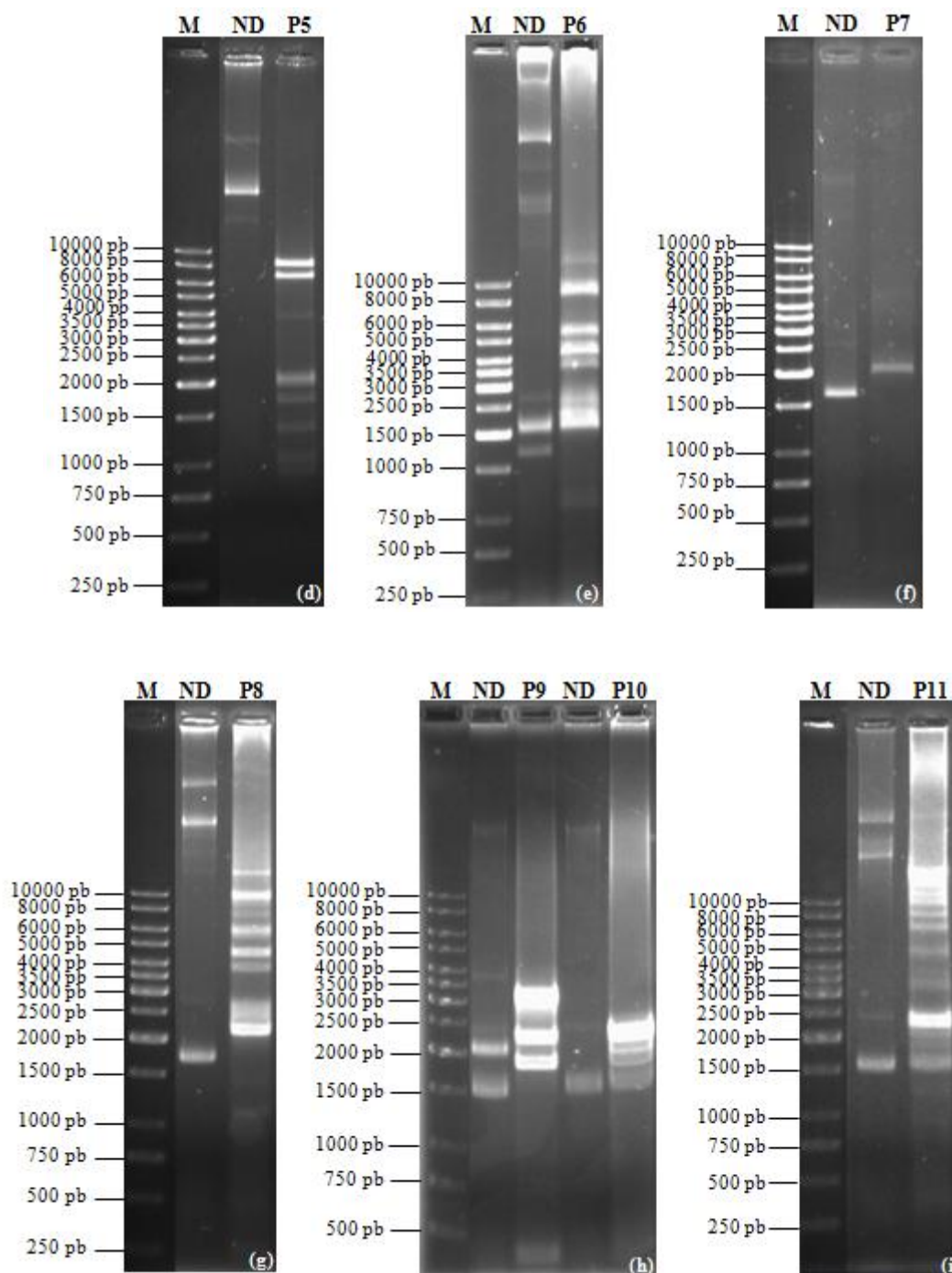


Figura 5 (continuação). Perfis de restrição de DNA plasmídico com *AccI*. Os perfis de restrição foram analisados por electroforese em gel de agarose a 1%. (d) Perfil P5; (e) Perfil P6; (f) Perfil P7; (g) Perfil P8; (h) Perfil P9 e P10; (i) Perfil P11. M: Marcador 1kb DNA Ladder GeneRuler™; ND: Plasmídeo não digerido.

É importante salientar que, mesmo após repetição, a digestão do DNA plasmídico das estirpes SM23 e SM25 mostrou-se incompleta, o que dificultou a definição do perfil de restrição. Ainda assim, visto aparentemente apresentarem perfis de bandas

semelhantes, estas estirpes foram preliminarmente colocadas no mesmo perfil de restrição, o perfil P4.

3.4 Classificação dos plasmídeos de acordo com perfis de restrição – Digestão com enzima de restrição *EcoRI*

Após a determinação dos perfis de restrição dos plasmídeos identificados com base nos resultados da digestão com a enzima *AccI*, foram seleccionadas para posterior análise as estirpes com apenas um plasmídeo, nomeadamente, os plasmídeos dos perfis P1, P2, P5, P7 e P10. Para tal, foi necessário confirmar o agrupamento destes plasmídeos, tendo sido realizada uma nova digestão do DNA plasmídico com uma enzima de restrição diferente, nomeadamente a enzima *EcoRI*.

A digestão com *EcoRI* dos plasmídeos presentes nas 12 estirpes anteriormente agrupadas no perfil P1, confirmou que todos apresentam o mesmo perfil de restrição após a digestão com *EcoRI*, como é possível constatar pelas Figuras 6 e 7. É importante destacar que as bandas adicionais observadas na linha 4 da Figura 6 e nas linhas 4 e 6 da Figura 7 são resultado de digestão incompleta. Além de identificar o perfil de restrição, foi também novamente calculado o tamanho do plasmídeo, com base nos fragmentos de restrição obtidos com *EcoRI*. Verificou-se uma diferença significativa no tamanho obtido com esta enzima (27,4 kb), quando comparado com aquele determinado após a digestão com *AccI* (19,4 kb). Isto dever-se-á provavelmente ao facto de os fragmentos resultantes da digestão com *AccI* apresentarem tamanhos muito próximos, o que origina bandas que não são facilmente distinguíveis na electroforese em gel de agarose. Assim, o tamanho mais correcto para o plasmídeo do perfil P1 será de aproximadamente 27,4 kb tendo em conta o perfil observado.

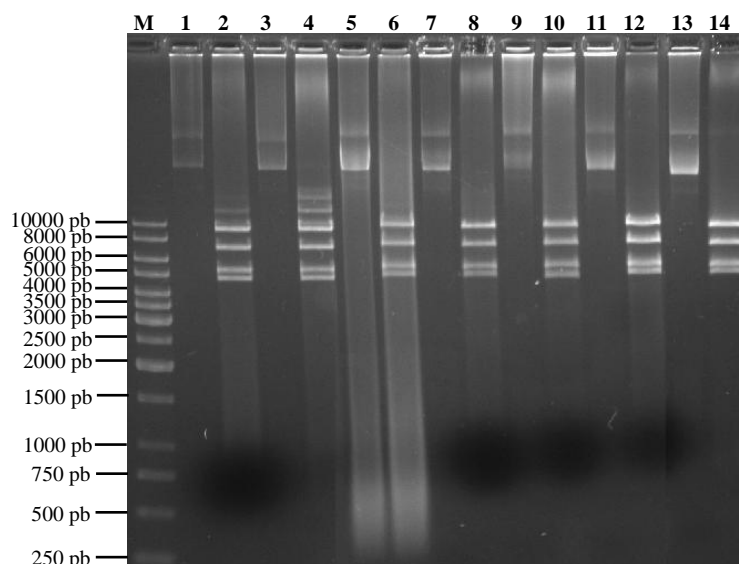


Figura 6. Electroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de restrição com *EcoRI* - perfil P1. M: marcador 1kb DNA Ladder GeneRuler™; **1:** pSM1; **2:** pSM1 digerido com *EcoRI*; **3:** pSM10; **4:** pSM10 digerido com *EcoRI*; **5:** pSM16; **6:** pSM16 digerido com *EcoRI*; **7:** pSM17; **8:** pSM17 digerido com *EcoRI*; **9:** pSM22; **10:** pSM22 digerido com *EcoRI*; **11:** pSM27; **12:** pSM27 digerido com *EcoRI*; **13:** pSM31; **14:** pSM31 digerido com *EcoRI*; **15:** pSM43; **16:** pSM43 digerido com *EcoRI*.

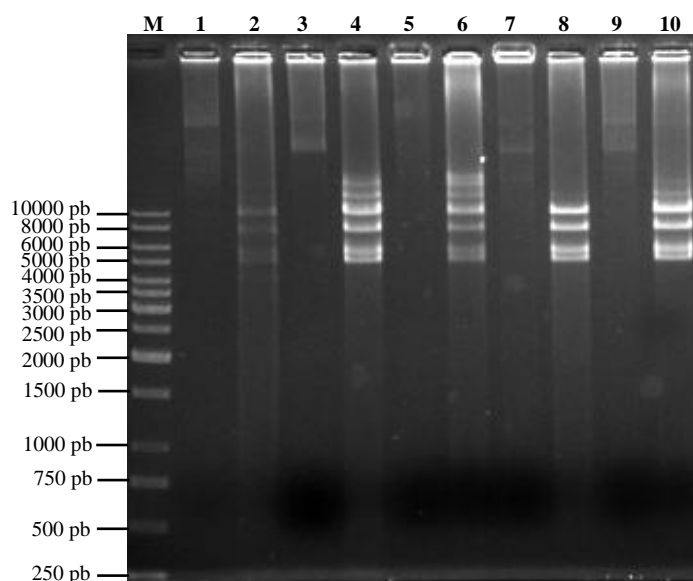


Figura 7. Electroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de restrição com *EcoRI* - perfil P1. M: marcador 1kb DNA Ladder GeneRuler™; **1:** pSM14; **2:** pSM14 digerido com *EcoRI*; **3:** pSM47; **4:** pSM31 digerido com *EcoRI*; **5:** pSM46; **6:** pSM46 digerido com *EcoRI*; **7:** pSM47; **8:** pSM47 digerido com *EcoRI*; **9:** pSM48; **10:** pSM48 digerido com *EcoRI*.

De seguida, foi realizado o mesmo procedimento para os plasmídeos correspondentes ao perfil de restrição P2, das estirpes SM11 e SM13. Também nesta situação foi possível confirmar o agrupamento feito anteriormente com base na restrição por *AccI*, tendo-se obtido um perfil de restrição idêntico após a sua digestão com *EcoRI*.

Quanto ao tamanho destes plasmídeos, tal como já verificado para o perfil P1, constatou-se uma diferença significativa entre o tamanho estimado após digestão com *AccI* (24,2 kb) e com *EcoRI* (36,6 kb), provavelmente devido ao facto de a digestão com *AccI* originar fragmentos de tamanhos semelhantes, que não se distinguem na análise por electroforese em gel de agarose (Figura 8).

Além dos perfis mencionados, foi realizada também a digestão com *EcoRI* do DNA plasmídico das estirpes SM23 e SM25 (perfil P4), visto ter havido dificuldade em distinguir os seus perfis de bandas e assim confirmar o agrupamento destas duas estirpes no mesmo perfil (Figura 8). Verificou-se que a estirpe SM23 apresenta um perfil de restrição idêntico ao de P1, passando assim a ser agrupado neste perfil. Já a estirpe SM25 apresenta pelo menos dois plasmídeos de grandes dimensões, passando a ser a única estirpe constituinte do perfil P4. Além disso, é possível constatar que um dos plasmídeos isolados de SM25, aparenta ter um perfil de restrição idêntico àquele observado para o perfil P1.

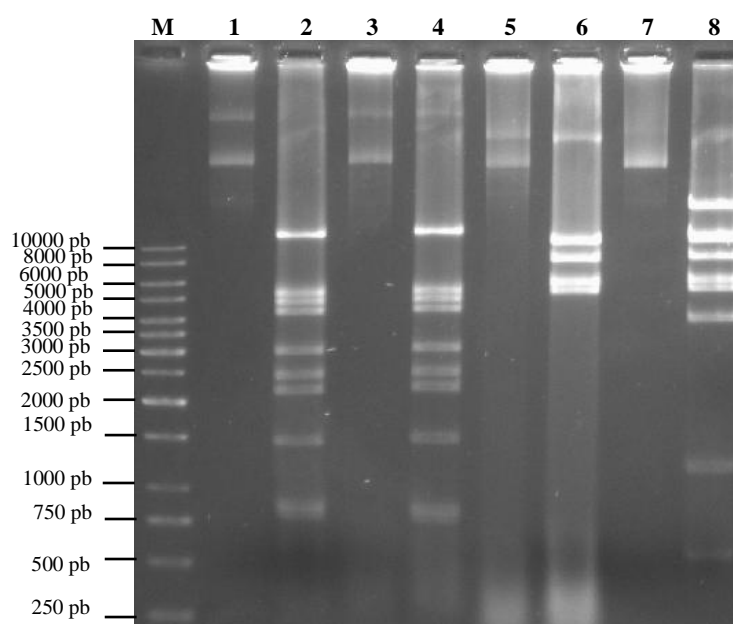


Figura 8. Electroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de restrição com *EcoRI* - Perfil P1, P2 e P4. Plasmídeos digeridos com *EcoRI* de acordo com o perfil obtido anteriormente com a enzima *AccI*. **M:** marcador 1kb DNA Ladder GeneRuler™; **Perfil P2 - 1:** pSM11; **2:** pSM11 digerido com *EcoRI*; **3:** pSM13; **4:** pSM13 digerido com *EcoRI*. **Perfil P1 - 5:** pSM23; **6:** pSM23 digerido com *EcoRI*. **Perfil P4 - 7:** pSM25; **8:** pSM25 digerido com *EcoRI*.

O plasmídeo pSM39, único correspondente ao perfil P5, foi também caracterizado com *EcoRI* para confirmar que apresentava um perfil de restrição distinto dos restantes constituídos apenas por um plasmídeo de grandes dimensões. Como é possível constatar pela Figura 9, o perfil de pSM39 é de facto distinto daqueles obtidos após a digestão dos plasmídeos dos perfis P1 e P2. Relativamente ao tamanho estimado anteriormente, também se verificaram diferenças, possivelmente devido à sobreposição de fragmentos de restrição no gel de electroforese. Neste caso o tamanho estimado foi 21,7 kb em oposição a 28,2 kb determinado após a digestão com *AccI*.

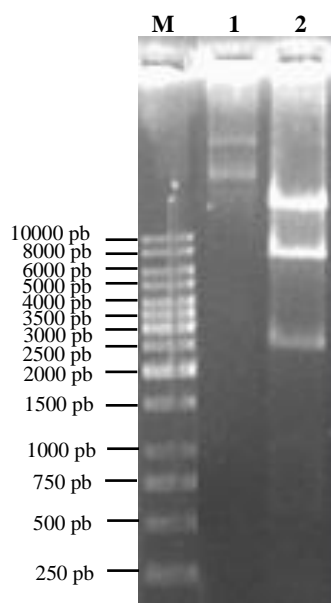


Figura 9. Electroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de restrição com *EcoRI* - Perfil P5. M: marcador 1kb DNA Ladder GeneRuler™; **1:** pSM39; **2:** pSM39 digerido com *EcoRI*.

Importa referir que dos cinco perfis constituídos por um único plasmídeo identificados neste trabalho (Tabela 12), o plasmídeo pSM39 (perfil P5) foi o único que não foi estudado em detalhe, por ser tema de outro trabalho em curso no grupo de investigação no qual foi desenvolvido este trabalho (18).

Finalmente compararam-se os perfis de bandas obtidos após digestão com *AccI* e *EcoRI* dos plasmídeos de SM4 (estirpe representativa do Perfil P7) e de SM26 (perfil P10). De acordo com a Figura 10, é possível constatar que são perfis distintos, em especial comparando os perfis de *AccI*, em que o plasmídeo do perfil P7 apresenta apenas uma banda e para o plasmídeo do perfil P10 se observam duas bandas. Relativamente aos tamanhos dos dois plasmídeos, observam-se diferenças para ambos,

estimando-se que o tamanho do plasmídeo do perfil P7 seja de 5,6 kb e o do perfil P10 de 5,3 kb.

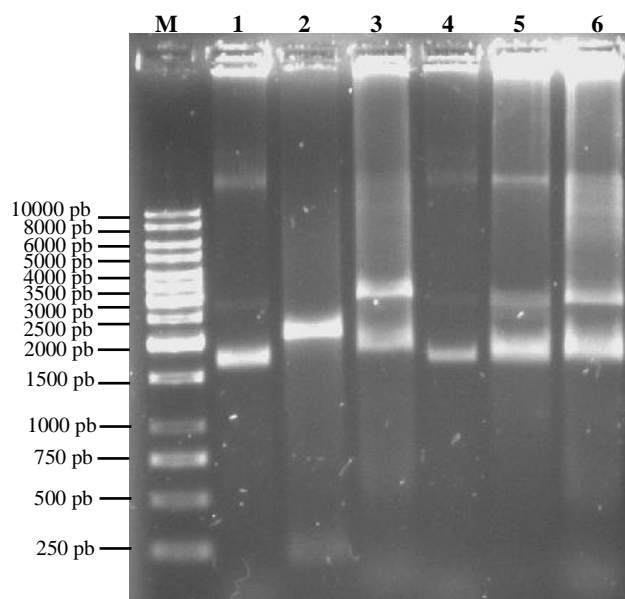


Figura 10. Electroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de restrição com *AccI* e *EcoRI* - Perfis P7 e P10. M: marcador 1kb DNA Ladder GeneRuler™; 1: pSM4; 2: pSM4 digerido com *AccI*; 3: pSM4 digerido com *EcoRI*; 4: pSM26; 5: pSM26 digerido com *AccI*; 6: pSM26 digerido com *EcoRI*.

Na Tabela 13 apresenta-se um resumo da informação obtida após a digestão dos diferentes plasmídeos com *EcoRI*.

Tabela 13. Perfis de restrição obtidos com a enzima *EcoRI* e número de estirpes correspondentes.

Perfil de Restrição	Número de plasmídeos	Tamanho (kb)	Número de estirpes	Estirpes
P1	1	27,4	13	SM1, SM10, SM14, SM16, SM17, SM22, SM23, SM27, SM31, SM43, SM46, SM47, SM48
P2	1	36,6	2	SM11, SM13
P5	1	22	1	SM39
P7	1	5,6	8	SM4, SM5, SM6, SM9, SM35, SM38, SM42, SM53
P10	1	5,3	1	SM26

3.5 Estudo do plasmídeo pSM1

3.5.1 Cura do plasmídeo pSM1

Uma vez agrupados os plasmídeos por perfis de restrição, foi escolhido um plasmídeo representativo do perfil P1 para caracterização adicional, tendo sido selecionado o plasmídeo pSM1, isolado da estirpe SM1.

O primeiro passo consistiu na cura do plasmídeo pSM1, para posteriormente estudar os efeitos da ausência deste plasmídeo nos fenótipos de susceptibilidade aos antibióticos e biocidas da estirpe curada, em comparação com a estirpe original. Este procedimento tem como principal vantagem a manutenção do *background* genético da estirpe, em comparação, por exemplo, com a introdução do plasmídeo numa estirpe susceptível.

A cura do plasmídeo pSM1 foi feita através de passagens sucessivas da estirpe SM1 em meio suplementado com concentrações sub-inibitórias crescentes de clorpromazina (CPZ), tendo em conta que a CMI para esta estirpe é 50 mg/L (19). De forma a verificar se este processo foi bem sucedido, prepararam-se placas a partir de diluições da cultura celular correspondente à última passagem (#11 – 22 mg/L de CPZ), de forma a obter colónias isoladas e submeter-se à extracção de DNA plasmídico. De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que nenhuma destas tinha sido curada, uma vez que em todas se observava a presença de uma banda de 27,4 kb, correspondente ao plasmídeo pSM1 (Figura 11).

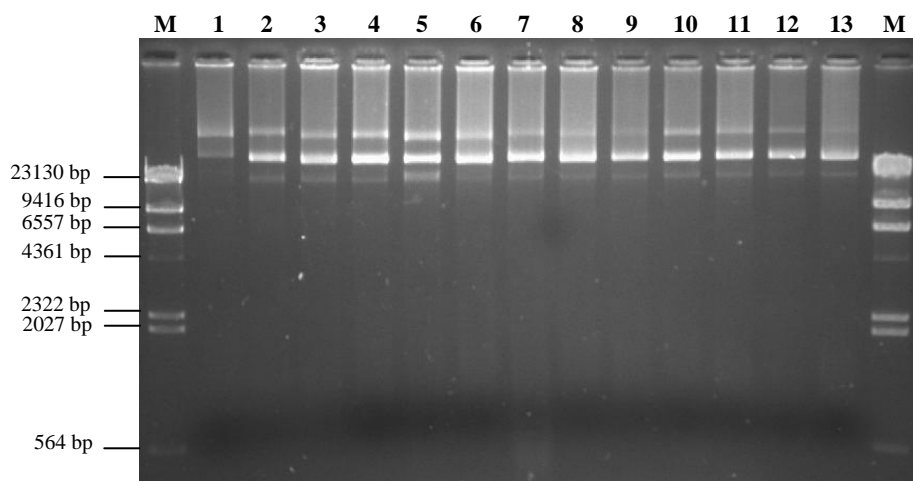


Figura 11. Electroforese em gel de agarose a 1% com o resultado da extracção de DNA plasmídico de colónias isoladas após 11ª passagem de SM1 com CPZ. M: Marcador DNA/ λ HindIII; 1: pSM1; 2 a 13: Preparação de DNA plasmídico a partir de colónias isoladas após o processo da cura do plasmídeo da estirpe SM1 – passagem #11.

Visto não ter sido conseguida a cura da estirpe SM1 através deste método, testaram-se de seguida duas abordagens diferentes em paralelo. Na primeira, inoculou-se uma nova cultura a partir do *stock* da passagem #11 da estirpe SM1 em TSB suplementado com a concentração sub-inibitória de 22 mg/L de CPZ, que se manteve durante quatro passagens adicionais. Na segunda abordagem, a partir da mesma cultura (*stock* da passagem #11 de SM1) fizeram-se passagens sucessivas até aos 30 mg/L de CPZ, ultrapassando o limiar da concentração sub-inibitória (Figura 2 – Materiais e Métodos).

Em cada situação, foram inoculadas placas de TSA a partir de diluições destas culturas de modo a se obter colónias isoladas. Seleccionaram-se, de forma aleatória, colónias isoladas, correspondentes a ambas as passagens, para se proceder à extracção de DNA plasmídico e verificar se os processos de cura tinham sido bem sucedidos.

Como é possível observar na Figura 12, identificou-se uma estirpe obtida a partir da passagem #15, em que após a extracção de DNA plasmídico não foi detectada a presença da banda correspondente a 27,4 kb presente na estirpe SM1 original.

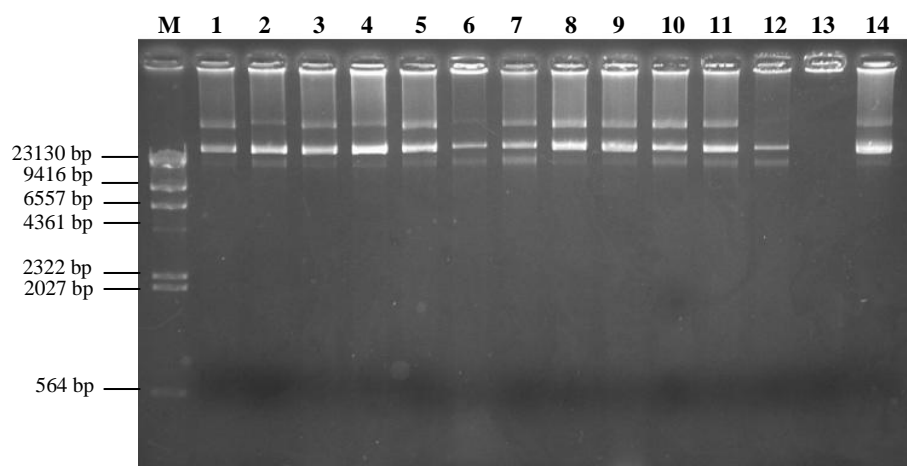


Figura 12. Electroforese em gel de agarose a 1% com os produtos da extracção de DNA plasmídico de colónias isoladas a partir da 15ª passagem de SM1 com CPZ (30 mg/L CPZ). M: Marcador DNA/ λ HindIII; 1: pSM1; 2 a 14: Preparação de DNA plasmídico a partir de colónias isoladas após o processo da cura do plasmídeo da estirpe SM1 – passagem #15. Amostra 13: ausência da banda correspondente ao plasmídeo pSM1.

Na Figura 13, identificaram-se três estirpes a partir da passagem #11.4 nas quais não se observou a banda de 27,4 kb correspondentes ao plasmídeo pSM1.

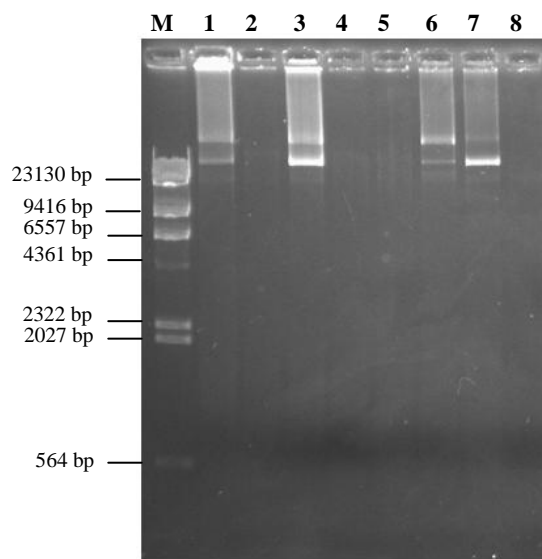


Figura 13. Electroforese em gel de agarose a 1% com os produtos da extração de DNA plasmídico de colónias isoladas a partir da passagem #11.4 de SM1 com CPZ (22 mg/L CPZ). M: Marcador DNA/ λ HindIII; 1: pSM1; 2 a 8: Preparação de DNA plasmídico a partir de colónias isoladas após o processo da cura do plasmídeo da estirpe SM1 - passagem #11.4. Amostras 2, 4, 5 e 8: ausência da banda correspondente ao plasmídeo pSM1.

3.5.2 Tipificação genética das estirpes curadas

De forma a garantir a pureza das estirpes utilizadas foi realizada a tipificação por análise dos perfis de macro-restrição com *Sma*I, para verificar se após a cura não se identificam diferenças entre estas e a estirpe original, para além da perda do plasmídeo.

No que diz respeito à estirpe SM1 original e às respectivas estirpes curadas (SM1-P11.4C1, SM1-P11.4C3, SM1-P11.4C4, SM1-P11.4C7), foi possível observar que todas apresentam um perfil de macro-restrição idêntico (Figura 14), eliminando a possibilidade de ter ocorrido contaminação durante o processo da cura do plasmídeo pSM1. Não foi possível obter o perfil de macro-restrição da estirpe SM1-P15C13, por eventual degradação do DNA, pelo que não se prosseguiu o estudo desta estirpe.

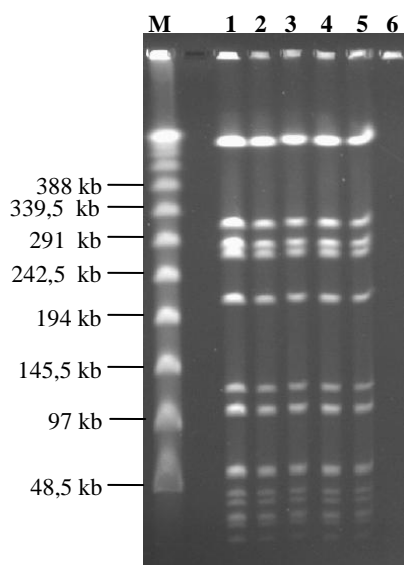


Figura 14. Análise em gel de agarose SeaKem LE a 1% dos produtos de macro-restrição com *Sma*I por PFGE. **M:** Marcador lambda Ladder PFG; **1:** SM1 (original); **2:** SM1-P11.4C1; **3:** SM1-P11.4C3; **4:** SM1-P11.4C4; **5:** SM1-P11.4C7; **6:** SM1-P15C13.

3.5.3 Determinação do fenótipo de susceptibilidade a compostos antimicrobianos

Tal como foi dito anteriormente, após a cura do plasmídeo pSM1 e de forma a analisar como a ausência deste plasmídeo afecta o perfil de resistência aos diferentes compostos antimicrobianos da estirpe SM1, procedeu-se à realização de testes de susceptibilidade aos compostos antimicrobianos através do método de Kirby-Bauer, para os antibióticos, e CMIs, para os biocidas e metais pesados, para as estirpes curadas.

3.5.3.1 Resistência aos antibióticos pelo método de Kirby-Bauer

Foi realizado o método de Kirby-Bauer para as estirpes curadas SM1-P11.4C1, SM1-P11.4C3, SM1-P11.4C4 e SM1-P11.4C7 e comparados os resultados com os da estirpe original (Tabela 14), de acordo com o protocolo descrito no ponto 2.2.2.1.

Tabela 14. Valores dos halos de inibição (em mm) e respectivos fenótipos para diferentes antibióticos da estirpe SM1 original (Passagem #0) e das estirpes curadas de pSM1^[A].

Antibiótico	Estirpes									
	SM1		SM1-P11.4C1		SM1-P11.4C3		SM1-P11.4C4		SM1-P11.4C7	
	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo
OXA	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R
AMP	11	R	17	R	17	R	17	R	17	R
AMC	11	R	15	R	15	R	15	R	15	R
PEN	10	R	15	R	15	R	15	R	15	R
NOR	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R
CIP	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R
CTX	6	R	8	R	8	R	6	R	8	R
GEN	24	S	22	S	25	S	29	S	23	S
TOB	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R
ERY	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R
CLI	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R
QDT	29	S	23	S	35	S	35	S	32	S
SXT	38	S	31	S	36	S	33	S	32	S
TET	34	S	28	S	33	S	28	S	27	S
LZD	34	S	29	S	29	S	31	S	30	S
CHL	27	S	28	S	27	S	24	S	23	S
MUP	43	AHLR	35	AHLR	35	AHLR	35	AHLR	32	AHLR
FUS	32	S	28	S	31	S	32	S	30	S

[A] Valores padronizados pelo CLSI (17) e EUCAST (apenas para o ácido fusídico) (25) para *breakpoint*. OXA: oxacilina; AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina-ácido clavulâmico; PEN: penicilina; NOR: norfloxacin; CIP: ciprofloxacina; CTX: cefotaxima; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina; ERY: eritromicina; CLI: clindamicina; QDT: Quinopristina/Dalfopristina; SXT: trimetoprim-sulfametoxazol; TET: tetraciclina; LZD: linezolida; CHL: cloranfenicol; MUP: mupirocina; FUS: ácido fusídico.

S: sensível; I: intermédio; R: resistente; AHLR: ausência de resistência de alto nível.

Comparando os fenótipos de resistência observados para a estirpe SM1 original e para as quatro estirpes curadas, não se verificam diferenças para a maioria dos antibióticos testados. No caso dos antibióticos da classe dos β -lactâmicos, nomeadamente a ampicilina, penicilina e amoxicilina-ácido clavulânico, observou-se um aumento consistente dos halos de inibição nas estirpes curadas, comparativamente àqueles observados para a estirpe original, embora as estirpes curadas se tenham mantido resistentes a estes antibióticos. Quanto à oxacilina, não se verificaram alterações nos halos de inibição. No que diz respeito aos restantes antibióticos, verificaram-se algumas alterações consideradas pontuais.

3.5.3.2 Resistência aos metais pesados e biocidas

Foi também comparada a susceptibilidade aos biocidas e metais pesados entre a estirpe SM1 e as estirpes curadas, por determinação de CMIs segundo o protocolo descrito no ponto 2.2.3.2.

Tabela 15. Valores de CMIs da estirpe SM1 original (Passagem #0) e das respectivas estirpes curadas de pSM1.

Compostos		Estirpes				
		SM1	SM1-P11.4C1	SM1-P11.4C3	SM1-P11.4C4	SM1-P11.4C7
Metais Pesados (mM)	Cd(CH ₃ COO) ₂	0,06	0,015	0,015	0,015	0,015
	AgNO ₃	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
	CuSO ₄	4	4	4	4	4
	ZnCl ₂	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Biocidas e corantes (µg/ml)	ACR	64	64	64	64	64
	PT	32	32	32	32	32
	BER	512	512	512	512	512
	EtBr	16	16	16	16	16
	CET	8	8	8	8	8
	CPC	4	4	4	4	4
	CTAB	8	8	8	8	8
	BAC	4	4	4	4	4
	TPP	64	64	64	64	64
	CHX	1	1	1	1	1
	CHXG (%)	0,0003125	0,0003125	0,0003125	0,0003125	0,0003125
	DC	16	16	16	16	16

ACR: Laranja de acridina; PT: Pentamidina; BER: Berberina; EtBr: Brometo de etídeo; CET: Cetrimida; CPC: Cloreto de cetilpiridínio; CTAB: Brometo de hexadeciltrimetilamónio; BAC: Cloreto de benzalcónio; TPP: Tetrafenilfosfónio; CHX: Diacetato de Clorexidina; CHXG: Digluconato de clorexidina; DC: Cloreto de Dequalínio.

Na Tabela 15 é possível observar que os valores de CMIs não sofreram alterações quando comparados os valores da estirpe SM1 original e as estirpes curadas. No que diz respeito aos metais pesados, os valores de CMI obtidos para as estirpes curadas também se mantiveram iguais aqueles obtidos para a estirpe original, à excepção do cádmio (Cd(CH₃COO)₂) em que o valor da CMI é mais baixo nas colónias curadas (0,015 mM), do que a estirpe original (0,06 mM), correspondendo a uma diferença de duas diluições. Uma vez que as culturas de SM1 curadas fenótipos indistinguíveis, escolheu-se uma única, SM1-P11.4C7, para os estudos subsequentes, sendo designada ao longo do resto desta Tese de estirpe SM1-curada.

3.5.4 Detecção de produção de β-lactamases

Tendo em conta os resultados nos ensaios de susceptibilidade aos antibióticos β-lactâmicos pelo método de Kirby-Bauer, em que se verificou um aumento da susceptibilidade da estirpe SM1-curada à penicilina, ampicilina e amoxicilina-ácido clavulânico, foi realizado o teste da nitrocefina para a detecção de β-lactamases, uma

vez que estes resultados sugeriam a presença de determinantes de resistência aos antibióticos β -lactâmicos no plasmídeo pSM1 (Figura 15).

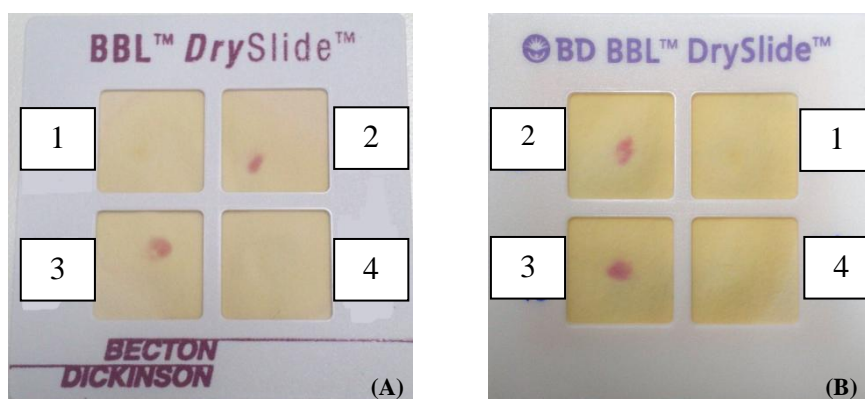


Figura 15. Teste de produção de β -lactamases pelo teste “BBL™ DrySlide™ Nitrocefin”. (A) Teste da nitrocefina sem indução; (B) Teste da nitrocefina após indução com penicilina. (1): Estirpe ATCC 25923 (controlo negativo); (2): SM39 (controlo positivo); (3): SM1 original; (4): SM1- curada.

Como é possível observar na Figura 15 – (A), verifica-se a produção de β -lactamase para a estirpe SM1 original, tal como o controlo positivo (SM39). Comparativamente com o resultado observado para a estirpe SM1-curada, verifica-se a ausência de produção de β -lactamase nesta estirpe, assim como acontece no controlo negativo. Deste modo, é possível constatar que o plasmídeo pSM1 tem na sua constituição um determinante capaz de codificar a produção de β -lactamase e que o mesmo não se encontra na estirpe SM1-curada.

De forma a confirmar os resultados obtidos, repetiu-se o teste da nitrocefina com as mesmas estirpes mas após uma prévia exposição das culturas a penicilina, uma vez algumas estirpes apenas produzem β -lactamase após indução por antibióticos da classe dos β -lactâmicos. Como é possível observar na Figura 15 – (B), os resultados obtidos anteriormente mantêm-se, confirmando-se a produção de β -lactamase na estirpe SM1 original (sem necessidade de indução pela penicilina) e a sua ausência na estirpe SM1-curada, mesmo após indução.

3.5.5 Pesquisa dos genes *blaZ* e *cadD*

De acordo com os resultados obtidos na caracterização fenotípica da estirpe SM1 e das estirpes curadas e tendo sido observadas diferenças ao nível da susceptibilidade aos β -lactâmicos e ao cádmio, antes e depois da cura do plasmídeo pSM1, foi possível

deduzir que o plasmídeo pSM1 inclui determinantes responsáveis por essas alterações. Por essa razão, foram pesquisados por PCR os genes *blaZ*, que codifica para uma β -lactamase, e *cadD*, um determinante associado a baixos níveis de resistência ao cádmio (21), utilizando os pares de *primers* *blaZ*_Fw e *blaZ*_Rv e *cadD*_Fw e *cadD*_Rv, respectivamente, descritos na Tabela 3 (Materiais e Métodos). Os resultados da amplificação por PCR de fragmentos internos a cada um destes genes são apresentados nas Figuras 16 e 17.

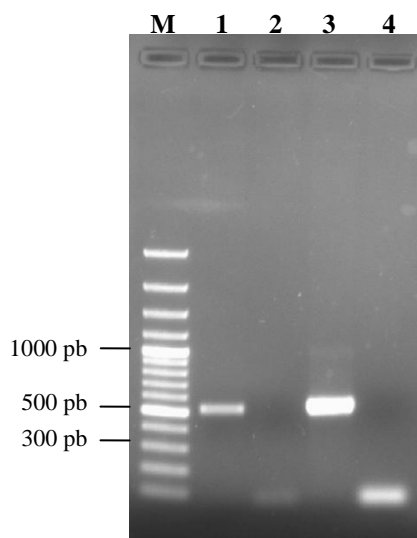


Figura 16. Electroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de amplificação de um fragmento interno ao gene *blaZ* a partir de DNA plasmídico de: 1: SM1-P0 (passagem 0); 2: SM1-curada; 3: SM39 (controle positivo); 4: controle negativo (água bi-distilada); M: Marcador 100 bp DNA Ladder Plus Gene Ruler.

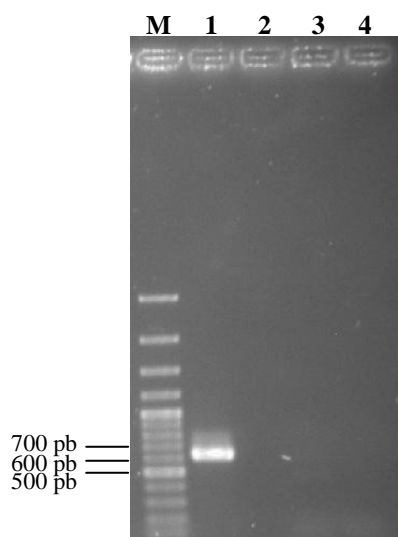


Figura 17. Electroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de amplificação de um fragmento interno ao gene *cadD* a partir de DNA plasmídico de: 1: SM1-P0 (passagem 0); 2: Poço sem amostra; 3: SM1-curada; 4: controle negativo (água bi-distilada); M: Marcador 100 bp DNA Ladder Plus Gene Ruler.

Tal como é possível observar pelas Figuras 16 e 17, foi possível confirmar a presença dos determinantes *blaZ* e *cadD* no plasmídeo pSM1, devido à presença das bandas de 533 pb e 614 pb, correspondentes a fragmentos internos dos respectivos genes. Em oposição, constatou-se que não ocorreu amplificação dos fragmentos internos aos genes no DNA plasmídico da estirpe SM1-curada, o que indica com grande probabilidade a perda do plasmídeo pSM1, o que poderá estar na origem das diferenças observadas nos fenótipos de susceptibilidade.

Em qualquer dos casos, os ensaios puderam ser validados dado não ter havido amplificação de qualquer banda nos controlos negativos e, no caso da reacção de amplificação de *blaZ*, por ter havido amplificação no controlo positivo.

3.6 Estudo do plasmídeo pSM11

3.6.1 Cura do plasmídeo pSM11

Tal como foi feito para o estudo do plasmídeo associado ao perfil P1, foi escolhida uma estirpe representativa do perfil P2, neste caso a estirpe SM11. A cura do plasmídeo pSM11 realizou-se através de passagens sucessivas da estirpe SM11 em TSB suplementado com incrementos sucessivos de CPZ, até à concentração de 22 mg/L (passagem #11). Após esta passagem, prepararam-se diluições da cultura e plaqueadas em TSA, de forma a obter colónias isoladas. Foram seleccionadas aleatoriamente algumas destas colónias às quais foi aplicado o protocolo de extracção de DNA plasmídico. Das quinze colónias analisadas, três não apresentam a banda correspondente ao plasmídeo pSM11 presente na estirpe SM11 original (Figura 18).

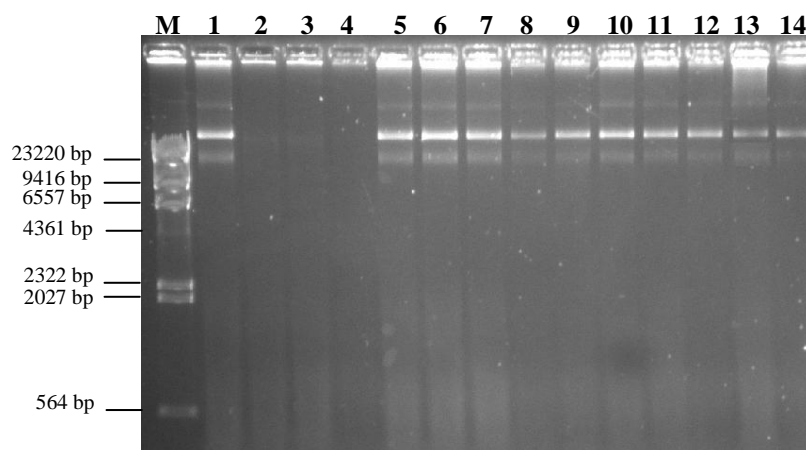


Figura 18. Electroforese em gel de agarose a 1% com os produtos da extração de DNA plasmídico de colônias isoladas a partir da passagem #11 de SM11 com CPZ (22 mg/L CPZ). M: marcador 1kb DNA Ladder GeneRuler™; 1: SM11 original; 2 a 14: Preparação de DNA plasmídico extraído de colônias obtidas após o processo da cura de pSM11. Amostras 2, 3 e 4: ausência da banda correspondente ao plasmídeo pSM11.

3.6.2 Tipificação genética das estirpes curadas

Tal como havia sido feito para a estirpe SM1, foi feita a tipificação por análise genética dos perfis de macro-restrição com *Sma*I de maneira a confirmar a não ocorrência de contaminação durante o processo de cura. Das três estirpes potencialmente curadas, só foi realizada a tipificação para duas (SM11-P11C1 e SM11-P11C3), uma vez que após observação da placa de TSA realizada a partir da cultura *stock* de SM11-P11C2, foi visível a ocorrência de contaminação da mesma.

Quando comparados os perfis de macro-restrição obtidos para a estirpe SM11, obtida a partir da passagem #0, e a da colônia curada SM11-P11C3 é possível constatar que não terá havido contaminação durante o processo de cura, visto ambos os perfis serem semelhantes assim como também em comparação com a estirpe SM11 original (Figura 19). Para a colônia SM11-P11C1, apesar de ter sido obtida na mesma passagem que SM11-P11C3, não foi obtido um perfil de macro-restrição visível, provavelmente por degradação do DNA, não sendo por isso possível garantir que a estirpe não sofreu alterações durante o processo da cura ou que não tenha ocorrido contaminação durante o processo de cura do plasmídeo pSM11. Por esta razão, prosseguiram-se os estudos com a estirpe SM11-P11C3, que será designada no resto da Tese por SM11-curada.

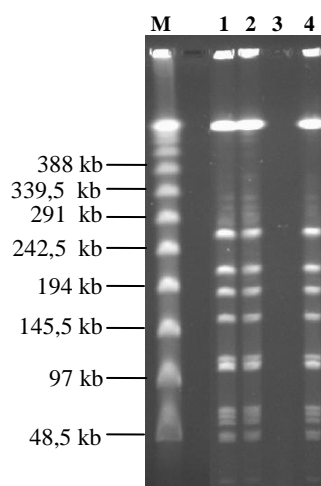


Figura 19. Análise em gel de agarose SeaKem LE a 1% dos produtos de macro-restrição com *Sma*I por PFGE. **M:** Marcador Lambda Ladder PFG; **1:** SM11 (original); **2:** SM11 – passagem 0; **3:** SM11-P11C1; **4:** SM11-P11C3.

3.6.3 Determinação do fenótipo de susceptibilidade aos compostos antimicrobianos

Após a confirmação da cura do plasmídeo pSM11, seguiu-se a abordagem anteriormente realizada para a estirpe SM1, com a determinação do perfil de susceptibilidade aos antibióticos, biocidas e metais pesados, para as estirpes SM11 e SM11-curada, de modo a identificar possíveis diferenças nos fenótipos de ambas.

3.6.3.1 Resistência aos antibióticos pelo método de Kirby-Bauer

Foi determinado o perfil de susceptibilidade aos antibióticos da estirpe SM11-curada, pelo método Kirby-Bauer de forma a identificar possíveis alterações em realção ao fenótipo da estirpe SM11 (Tabela 16).

Tabela 16. Valores dos halos de inibição (em mm) da estirpe SM11 (Passagem 0) e da estirpe SM11-curada para os diferentes antibióticos^[A].

Antibiótico	Estirpes			
	SM11		SM11-curada	
	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo
OXA	6	R	6	R
AMP	6	R	6	R
AMC	6	R	6	R
PEN	8	R	6	R
NOR	6	R	6	R
CIP	6	R	6	R
CTX	6	R	6	R
GEN	22	S	22	S
TOB	25	S	22	S
ERY	30	S	28	S
CLI	33	S	28	S
QDT	28	S	24	S
SXT	30	S	32	S
TET	26	S	25	S
LZD	30	S	28	S
CHL	24	S	23	S
MUP	37	AHLR	30	AHLR
FUS	30	S	30	S

[A] Valores padronizados pelo CLSI (17) e EUCAST (apenas para o ácido fusídico) (25) para *breakpoint*. OXA: oxacilina; AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina-ácido clavulânico; PEN: penicilina; NOR: norfloxacin; CIP: ciprofloxacina; CTX: cefotaxima; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina; ERY: eritromicina; CLI: clindamicina; QDT: quinopristina/dalfopristina; SXT: trimetoprim-sulfametoxazol; TET: tetraciclina; LZD: linezolida; CHL: cloranfenicol; MUP: mupirocina; FUS: ácido fusídico.

S: sensível; I: intermédio; R: resistente; AHLR: ausência de resistência de alto nível.

No caso das estirpes mencionadas na Tabela 16, não se verificam alterações significativas entre o tamanho dos halos de inibição e consequentemente nos fenótipos de resistência aos antibióticos, ou seja, ambas apresentam o mesmo fenótipo de resistência aos β -lactâmicos testados, oxacilina, ampicilina, amoxicilina-ácido clavulânico, penicilina e à cefotaxima, e às fluoroquinolonas, ciprofloxacina e norfloxacin. Para os restantes antibióticos verificam-se algumas variações consideradas pontuais, embora no caso da mupirocina esta diferença seja mais notória.

3.6.3.2 Resistência aos metais pesados e biocidas

Foi também determinado o perfil de susceptibilidade para os biocidas e metais pesados, cujos resultados se encontram na Tabela 17.

Tabela 17. Valor de CMI das estirpes SM11 e SM11-curada.

Compostos		Estirpes	
		SM11	SM11-curada
Metais Pesados (mM)	Cd(CH ₃ COO) ₂	1	0,0075
	AgNO ₃	0,125	0,125
	CuSO ₄	4	4
	ZnCl ₂	1	0,25
Biocidas e corantes (µg/ml)	ACR	64	64
	PT	128	128
	BER	512	512
	EtBr	32	32
	CET	8	8
	CPC	4	4
	CTAB	8	8
	BAC	4	4
	TPP	128	128
	CHX	1	1
	CHXG	0,00015625	0,00015625
	DC	16	16

ACR: Laranja de acridina; PT: Pentamidina; BER: Berberina; EtBr: Brometo de etídeo; CET: Cetrimida; CPC: Cloreto de cetilpiridínio; CTAB: Brometo de hexadeciltrimetilamônio; BAC: Cloreto de benzalcônio; TPP: Brometo de tetrafenilfosfônio; CHX: Diacetato de Clorexidina; CHXG: Digluconato de clorexidina; DC: Cloreto de Dequalínio.

De acordo com os resultados obtidos, não se verificam diferenças entre os perfis de susceptibilidade dos biocidas e corantes, visto que os valores de CMI obtidos para a estirpe curada e a original são idênticos para todos os compostos. O mesmo se verifica para dois dos metais pesados testados, a prata e o cobre, em que também não houve alteração dos valores de CMI obtidos antes e depois da cura do plasmídeo.

Por outro lado, foram observadas diferenças para o cádmio e zinco, sendo que a estirpe curada apresenta maior susceptibilidade a ambos os compostos comparativamente à estirpe original, sendo esta diferença mais significativa para o cádmio (Tabela 17).

3.6.4 Pesquisa do gene *cadA*

As diferenças observadas nos valores de CMI para o cádmio e zinco entre a estirpe SM11 e a estirpe SM11-curada sugerem que o plasmídeo pSM11 transporta um determinante envolvido na resistência a estes compostos. Visto existirem dados acerca da associação entre a resistência ao cádmio em simultâneo com um nível baixo de resistência ao zinco e a presença do determinante plasmídico *cadA* (38, 62, 117), foi pesquisada a presença deste gene através de amplificação de um fragmento interno do mesmo, utilizando os *primers* *cadA_Fw* e *cadA_Rv* descritos na Tabela 3 (Materiais e Métodos).

Tal como mostra a Figura 20, é possível observar uma banda de 553 pb correspondente a um fragmento interno ao gene *cadA* no DNA plasmídico extraído da estirpe SM11 original, bem como no DNA plasmídico da estirpe SM39 (usada como controlo positivo). Por outro lado, verifica-se a ausência de amplificação deste fragmento para a estirpe SM11-curada, o que confirma a presença do determinante *cadA* no plasmídeo pSM11 assim como a eficiência do processo de cura do mesmo.

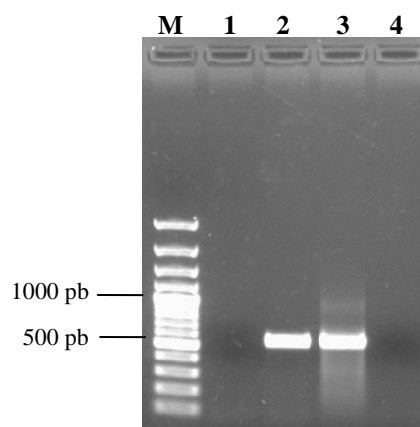


Figura 20. Electroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de amplificação de um fragmento interno ao gene *cadA* a partir da extracção de DNA plasmídico de: 1: SM11-curada; 2: SM11 (passagem #0); 3: SM39 (controlo positivo); 4: controlo negativo (água bi-destilada); M: Marcador 100 bp DNA Ladder Plus Gene Ruler.

3.7 Estudo dos plasmídeos pSM4 e pSM26

3.7.1 Cura do plasmídeos pSM4 e pSM26

Além da cura dos plasmídeos de maiores dimensões (pSM1 e pSM11), foi também feita a tentativa de curar plasmídeos de menores dimensões (< 6 kb), de forma a analisar o efeito da perda destes no fenótipo de susceptibilidade aos compostos antimicrobianos. Para isso, foi aplicado o método de cura já anteriormente utilizado para se proceder à cura dos plasmídeos das estirpes SM4 (perfil P7) e SM26 (perfil P10).

Depois de obtidas colónias isoladas de SM4 e SM26 a partir das respectivas 11^a passagens em CPZ, foram escolhidas aleatoriamente algumas dessas colónias para proceder à extracção de DNA plasmídico.

No total foi realizada a extracção de DNA plasmídico a partir de 38 colónias da estirpe SM4 e de 43 colónias da estirpe SM26. No caso da estirpe SM4, não possível obter a cura do plasmídeo pSM4 (Figura 21), razão pela qual não se prosseguiu o estudo desta estirpe.

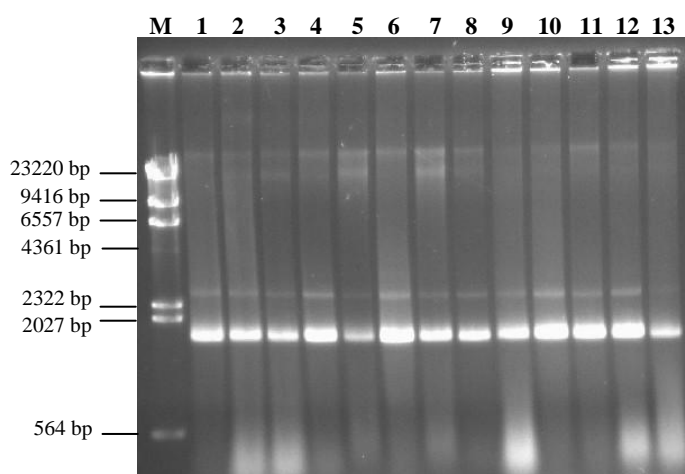


Figura 21. Electroforese em gel de agarose a 1% com o resultado da extracção de DNA plasmídico de colónias isoladas a partir da passagem #11 de SM4 com CPZ (22 mg/L CPZ). M: marcador 1kb DNA Ladder GeneRuler™; 1: pSM4 (original); 2 a 13: Preparação de DNA plasmídico extraído de colónias obtidas após o processo da cura de pSM4.

Em relação à estirpe SM26, apenas foi identificada uma única colónia potencialmente curada (SM26-P11C35), como é possível observar na Figura 22.

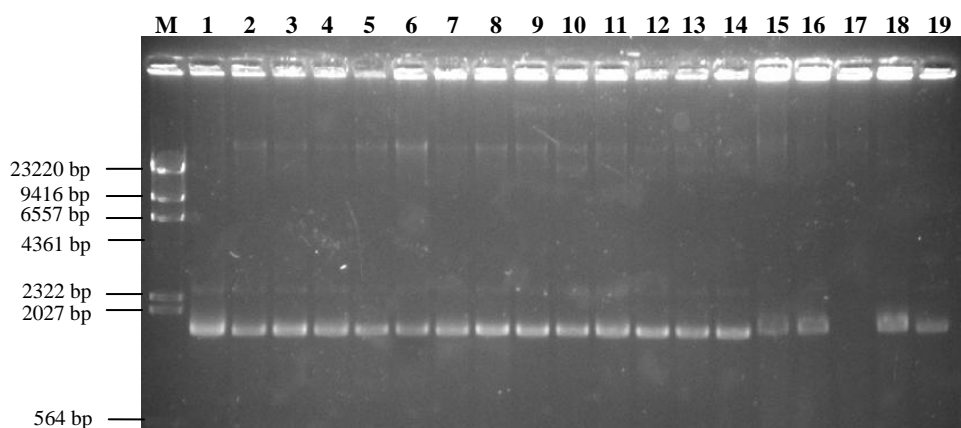


Figura 22. Electroforese em gel de agarose a 1% com o resultado da extração de DNA plasmídico de colônias isoladas a partir da passagem #11 de SM26 com CPZ (22 mg/L CPZ). M: marcador 1kb DNA Ladder GeneRuler™; 1: pSM26 (original); 2 a 18: Preparação de DNA plasmídico extraído de colônias obtidas após o processo da cura de pSM26; 17: Ausência da banda correspondente ao plasmídeo pSM26.

Como é possível constatar pela Figura 22, a estirpe SM26-P11C35, não apresenta a banda correspondente ao plasmídeo pSM26. Desta forma, prosseguiram-se os estudos com esta estirpe de forma a identificar possíveis alterações nos fenótipos de susceptibilidade aos compostos antimicrobianos entre a estirpe original e a potencialmente curada. A estirpe curada SM26-P11C35 será designada no resto da Tese por SM26-curada.

3.7.2 Tipificação genética das estirpes curadas

Tal como anteriormente, foi realizada a tipificação genética da estirpe SM26 original e SM26-curada, por comparação dos perfis de macro-restrição com *Sma*I (Figura 23).

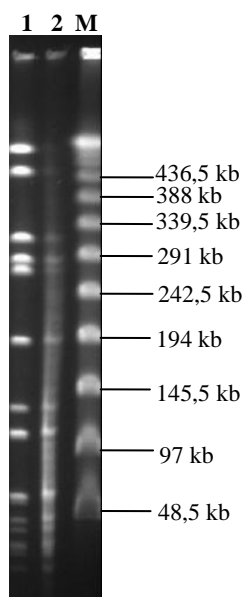


Figura 23. Electroforese em gel de agarose SeaKem LE a 1% dos produtos de macro-restrição com *SmaI* por PFGE. 1: SM26 – passagem #0; 2: SM26-curada; M: Marcador Lambda Ladder PFG.

Apesar de ter ocorrido degradação parcial do DNA da estirpe SM26-curada, é possível verificar que os dois perfis de macro-restrição são idênticos, confirmando-se assim que não ocorreu contaminação durante o processo da cura do plasmídeo pSM26.

3.7.3 Determinação do fenótipo de susceptibilidade aos compostos antimicrobianos

Seguindo o raciocínio explicado anteriormente para a análise dos plasmídeos pSM1 e pSM11, foram realizados testes de susceptibilidade aos antibióticos, biocidas e metais pesados de maneira a identificar possíveis diferenças entre os fenótipos das estirpes antes e após o processo da cura do plasmídeo pSM26 que possam estar associados à presença de determinantes codificados por este plasmídeo.

3.7.3.1 Resistência aos antibióticos pelo método de Kirby-Bauer

Na Tabela 18 estão descritos os valores dos halos de inibição da estirpe SM26 (correspondente à passagem #0) e da colônia SM26-curada observados para os antibióticos testados.

Tabela 18. Valores dos halos de inibição (em mm) da estirpe SM26 (Passagem #0) e da estirpe SM26-curada para os diferentes antibióticos^[A].

Antibiótico	Estirpes			
	SM26		SM26-curada	
	Halo	Fenótipo	Halo	Fenótipo
OXA	6	R	6	R
AMP	6	R	6	R
AMC	6	R	6	R
PEN	14	R	12	R
NOR	6	R	6	R
CIP	6	R	6	R
CTX	6	R	6	R
GEN	22	S	25	S
TOB	26	S	24	S
ERY	6	R	30	S
CLI	40(D)	R ⁽¹⁾	37	S
QDT	30	S	27	S
SXT	32	S	32	S
TET	30	S	34	S
LZD	30	S	34	S
CHL	25	S	29	S
MUP	40	AHLR	40	AHLR
FUS	32	S	32	S

[A] Valores padronizados pelo CLSI (17) e EUCAST (apenas para o ácido fusídico) (25) para *breakpoint*. OXA: oxacilina; AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina-ácido clavulâmico; PEN: penicilina; NOR: norfloxacin; CIP: ciprofloxacina; CTX: cefotaxima; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina; ERY: eritromicina; CLI: clindamicina; QDT: Quinopristina/Dalfopristina; SXT: trimetoprim-sulfametoxazol; TET: tetraciclina; LZD: linezolida; CHL: cloranfenicol; MUP: mupirocina; FUS: ácido fusídico.

S: sensível; I: intermediário; R: resistente; AHLR: ausência de resistência de alto nível; (D) Halo em forma de “D”; (1) Resistência induzida.

Relativamente ao tamanho dos halos de inibição, não se identificaram diferenças significativas que possam estar associadas à perda de determinantes plasmídicos, mantendo-se assim os fenótipos de resistência inalterados.

As principais diferenças foram observadas nos fenótipos de resistência à eritromicina e clindamicina. Observou-se um aumento significativo do halo de inibição em redor do disco de eritromicina, na medida em que a estirpe original não apresentava um halo de inibição e a estirpe curada passa a demonstrar um halo de 30 mm de diâmetro, o que corresponde a uma alteração do fenótipo de resistente para susceptível a este antibiótico. Quanto à clindamicina, a estirpe SM26 apresentava um fenótipo de resistência induzida a este antibiótico que na estirpe SM26-curada se deixa de observar, na medida em que o halo de inibição em redor do disco deixou de apresentar a forma em “D” característica desse fenótipo (Figura 24).

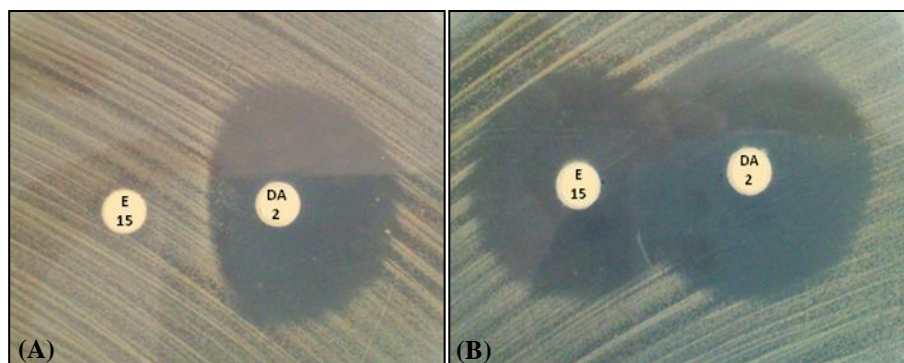


Figura 24. Ensaio de indução de resistência à clindamicina (“D-teste”). (A) Placa de MHA com estirpe SM26 original (passagem #0) – D-teste positivo (halo em forma de “D”) e ausência de halo de inibição à volta do disco de eritromicina; (B) Placa de MHA com estirpe SM26-curada – “D-teste” negativo (ausência de halo em forma de D).

Tendo em conta este resultado, é possível constatar que o plasmídeo isolado da estirpe SM26 é responsável pelo fenótipo de resistência induzida aos macrólidos, lincosamidas e estreptograminas do tipo B (MLS_{Bi}), observado para esta estirpe, o qual terá sido perdido com o processo da cura de pSM26.

3.7.3.2 Resistência aos metais pesados e biocidas

Além dos antibióticos, foi também identificado o perfil de susceptibilidade aos biocidas e metais pesados através da determinação das CMI_s para os mesmos, tal como foi feito para as outras estirpes.

Tabela 19. Valor de CMIs⁽¹⁾ das estirpes SM26 original e SM26-curada.

Compostos		Estirpes	
		SM26	SM26-curada
Metais Pesados (mM)	Cd(CH ₃ COO) ₂	1	1
	AgNO ₃	0,125	0,125
	CuSO ₄	4	4
	ZnCl ₂	1	1
Biocidas e corantes (µg/ml)	ACR	64	64
	PT	16	16
	BER	128	128
	EtBr	8	8
	CET	4	4
	CPC	0,5	0,5
	CTAB	2	2
	BAC	2	2
	TPP	16	16
	CHX	0,5	0,5
	CHXG	0,0000625	0,0000625
	DC	4	4

PT: Pentamidina; BER: Berberina; EtBr: Brometo de etídeo; ACR: Laranja de acridina; CET: Cetrimida; CPC: Cloreto de cetilpiridínio; CTAB: Brometo de hexadeciltrimetilamónio; BAC: Cloreto de benzalcónio; TPP: Brometo de tetrafenilfosfónio; CHX: Diacetato de Clorexidina; CHXG: Digluconato de clorexidina; DC: Cloreto de dequalínio.

⁽¹⁾ Estes ensaios foram realizados em triplicado.

Como é possível observar pelos dados apresentados na Tabela 19, não são observadas diferenças nos perfis de susceptibilidade aos biocidas e metais pesados entre as duas estirpes, original e curada.

3.7.4 Amplificação por PCR dos genes *ermB* e *ermC*

Após a realização do antibiograma constatou-se a perda do fenótipo MLS_{Bi} na estirpe SM26-curada. Para identificar o determinante responsável por esse fenótipo, optou-se por fazer a pesquisa da presença dos genes *ermB* e *ermC*. Esta escolha foi feita com base no facto de, entre os genes do tipo *erm* (do inglês *erythromycin ribossomal methylase*) descritos em plasmídeos de *S. aureus* (57, 69, 90, 114), estes serem os mais prevalentes (2, 93).

Para tal foi feita a amplificação por PCR de fragmentos internos dos genes *ermB* e *ermC* a partir de amostras de DNA plasmídico das estirpes SM26 e SM26-curada, cujos resultado se apresentam na Figura 25.

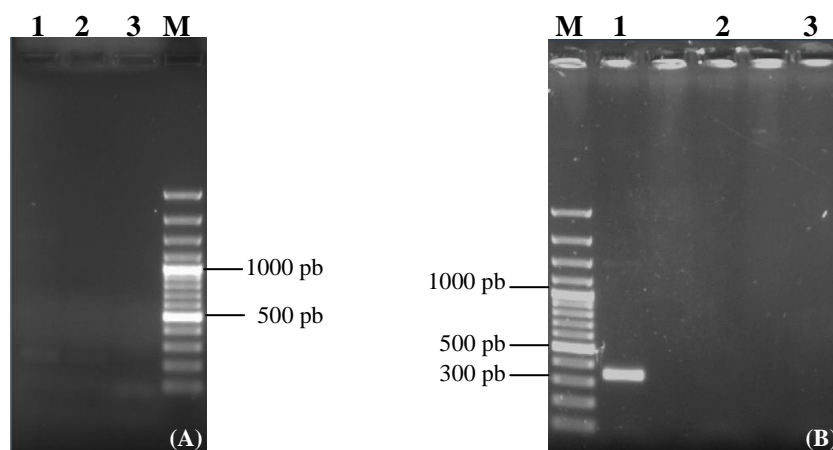


Figura 25. Electroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de amplificação de um fragmento interno aos genes *ermB* (A) e *ermC* (B) após extracção de DNA plasmídico. M: Marcador 100 bp DNA Ladder Plus Gene Ruler; 1: SM26 (passagem #0); 2: SM26-curada; 3: controlo negativo (água bi-destillada).

Tendo em conta a Figura 25 – (A), tanto a estirpe SM26 como a estirpe SM26-curada não apresentam a banda de 433 pb correspondente ao fragmento do determinante *ermB*. Por outro lado, confirma-se a presença do gene *ermC* em pSM26, uma vez que foi possível detectar a banda de 348 pb correspondente ao fragmento deste gene - Figura 25 – (B). Por outro lado, verifica-se a ausência de amplificação deste fragmento para a estirpe SM26-curada. Em resumo, estes resultados confirmam a presença do determinante *ermC* no plasmídeo pSM26, assim como a eficiência do processo de cura do mesmo.

4 Discussão e Conclusões

S. aureus é um agente patogénico que continua a despertar uma grande preocupação, devido à sua virulência, à sua capacidade em causar uma vasta diversidade de infecções e de se adaptar a diferentes condições ambientais, além de permanecer um importante agente de infecções nosocomiais (47, 61). Além disso, o facto de muitas destas infecções estarem associadas a estirpes resistentes a diversos compostos antimicrobianos, nomeadamente as estirpes MRSA, também é um motivo de alarme e com significativo impacto económico (11, 61, 65, 104, 105).

A resistência a compostos antimicrobianos é normalmente adquirida por transferência horizontal de genes provenientes de elementos externos à célula, porém as mutações cromossómicas e a selecção dos antibióticos também são factores importantes (11). Desses elementos externos, os plasmídeos figuram entre os mais importantes, pois são EGMs capazes de conferir características vantajosas nomeadamente resistência a diferentes agentes antimicrobianos (45). Por esta razão, o estudo dos plasmídeos e dos seus determinantes é de grande interesse para perceber o seu contributo para o fenótipo de resistência aos diferentes compostos antimicrobianos.

O trabalho desenvolvido teve como principal objectivo a identificação de determinantes de resistência a compostos antimicrobianos, presentes nos plasmídeos de uma colecção de estirpes de *S. aureus* isoladas num laboratório hospitalar de Lisboa. Para isso, foram isolados e caracterizados os plasmídeos presentes nesta colecção de estirpes e também determinados os fenótipos de susceptibilidade a um conjunto de diferentes compostos antimicrobianos, nomeadamente antibióticos, biocidas e metais pesados. Posteriormente foram seleccionadas algumas estirpes, com base no seu perfil plasmídico, de forma a apurar a importância do mesmo nos fenótipos de resistência através da comparação dos valores de CMIs e do antibiograma antes e depois da cura dos plasmídeos e da detecção de determinantes de resistência.

Após a extracção de DNA plasmídico, identificou-se a presença de plasmídeos em 43 das 52 estirpes (82,7%) que compunham a colecção em estudo. Tendo como base o estudo realizado por Shearer *et al.* (2011) (96), que pretendeu caracterizar o conteúdo plasmídico de uma vasta colecção de estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas em diversas partes do mundo e ao longo de 70 anos, os plasmídeos foram digeridos com a enzima de restrição *AccI*, tendo sido identificados 11 perfis de restrição distintos, constituídos por um ou mais plasmídeos.

Tendo em conta estes perfis e os plasmídeos que os constituem, é possível constatar que a maioria é composta por plasmídeos de grandes dimensões, tendo em consideração tanto os perfis com apenas um plasmídeo como os perfis com dois plasmídeos, perfazendo um total de oito perfis e 33 estirpes. Verifica-se ainda que alguns dos perfis com mais do que um plasmídeo incluem muito provavelmente plasmídeos que constituem perfis individuais noutras estirpes. Dois exemplos disso são os perfis P3 e P4, os quais incluem pelo menos dois plasmídeos em que um deles (no caso de P3, será o plasmídeo de maior dimensão) será provavelmente idêntico àquele que constitui o perfil P1.

Estes resultados vão de encontro ao que foi observado por Shearer *et al.* (2011), em que numa colecção de 280 estirpes clínicas de *Staphylococcus* spp., a maioria dos plasmídeos identificados apresentam dimensões superiores a 20 kb. A digestão dos plasmídeos com *AccI* permitiu o seu agrupamento num total de 106 perfis de restrição, verificando-se no entanto que três destes perfis agrupavam a maioria dos plasmídeos de grandes dimensões (> 20 kb) (96).

Embora pela definição mais consensual de estirpe (108), os 52 *S. aureus* estudados neste trabalho possam corresponder na realidade a um número inferior de estirpes, definidas pelo tipo e subtipo de PFGE, optou-se por considerar um conjunto de 52 estirpes, tendo em conta possíveis diferenças quer a nível genotípico quer a nível fenotípico, que pudessem ser encontradas durante este trabalho.

Relativamente à colecção em análise, verificou-se num estudo anterior, que a maioria dos *S. aureus* isolados se agrupava em dois clones, definidos pelos padrões de macro-restrição com *SmaI* A e E, cada um incluindo diversos sub- clones (19). Verifica-se agora que entre as 43 estirpes das quais foram isolados plasmídeos, apenas dois não pertencem a estes clones (Tabela 20). Assim, poder-se-á colocar a hipótese de que os plasmídeos presentes nestas estirpes possam estar a conferir características vantajosas às estirpes dos clones A e E, que facilitem a sua disseminação em ambiente hospitalar, em particular naquele onde estas estirpes foram isoladas (Tabela 20). Por outro lado, as estirpes das quais não foram isolados plasmídeos, agrupam-se maioritariamente num clone predominante e distinto daqueles mencionados (Tabela 20), o que novamente poderá indiciar que estas estirpes beneficiem de alguma vantagem neste ambiente, neste caso não associada a determinantes plasmídicos.

Tabela 20. Associação entre os perfis de restrição (com *AccI* e *EcoRI*) e o tipo clonal.

Perfil de Restrição	Clone (e sub- clones) ^[1]	Número de estirpes
P1	A (1, 2, 3, 4, 6 e 9)	13
P2	E (1 e 4)	2
P3	A (1, 5, 7, 8 e 11)	6
P4	A1	1
P5	G1	1
P6	E1	1
P7	A5 e E (1, 2, 3, 6 e 7)	8
P8	E (1 e 3)	8
P9	F1	1
P10	A10	1
P11	A11	1
Ausência de DNA plasmídico	A1, B (1, 2, 3 e 4) e E5	9

[1] Definidos por análise de perfis de macro-restrição com *SmaI* (19)

• Estudo do plasmídeo pSM1 – Perfil P1

Ao comparar o perfil de restrição P1, obtido neste estudo, com o perfil de restrição RT2, obtido por Shearer *et al.* (2011), constatou-se que estes dois perfis são coincidentes. Esta observação foi possível através da realização da digestão *in silico* (Materiais e Métodos) das sequências nucleotídicas dos plasmídeos agrupados no perfil RT2 com as enzimas *AccI* e *EcoRI*. Através da visualização das figuras correspondentes aos possíveis géis de electroforese obtidos após digestão com *AccI* (Figura 26), idealizadas nas mesmas condições que aqueles obtidos ao longo deste trabalho, foi possível comparar o perfil de bandas de P1 com o perfil de RT2 e constatar que são idênticos. Contudo, existem bandas presentes no perfil de restrição RT2 (Figura 26 – 1), de 3419 pb e 3319 pb, 1298 pb, 1273 pb e 1224 pb, 1007 pb e 928 pb, que não são distinguíveis no perfil P1 (Figura 26 – 2), provavelmente devido ao facto de estes fragmentos apresentarem pesos moleculares muito semelhantes, que não são distinguíveis no gel de electroforese. Este facto explica também as diferenças observadas nos tamanhos estimados deste plasmídeo (e possivelmente também dos restantes) após a digestão com *AccI* e com *EcoRI* (Tabelas 12 e 13 – Resultados). A digestão *in silico* foi feita com as sequências nucleotídicas dos plasmídeos pSK67, SAP074A, SAP048A, pWBG744 e SAP012A, que apresentam o perfil RT2.

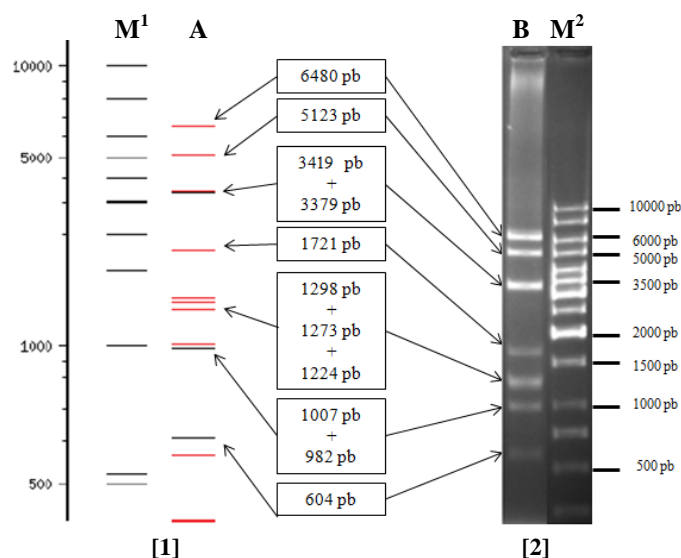


Figura 26. Comparação dos perfis de restrição com *AccI*. [1] Perfil de bandas obtido com o programa NEBcutter V2.0 dos plasmídeos com perfil RT2 (96). M¹: Marcador 1kb; 1: SAP074A. [2] Electroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de restrição com *AccI* do plasmídeo de SM1. M²: marcador 1kb DNA Ladder GeneRuler™; 2: Perfil de restrição P1 - plasmídeo pSM1.

Além da digestão com *AccI*, foi também aplicado o mesmo procedimento com a enzima *EcoRI*, também utilizada para a distinção dos plasmídeos deste estudo. Também neste caso se verifica que os perfis de restrição obtidos são iguais aos de RT2 (Figura 27).

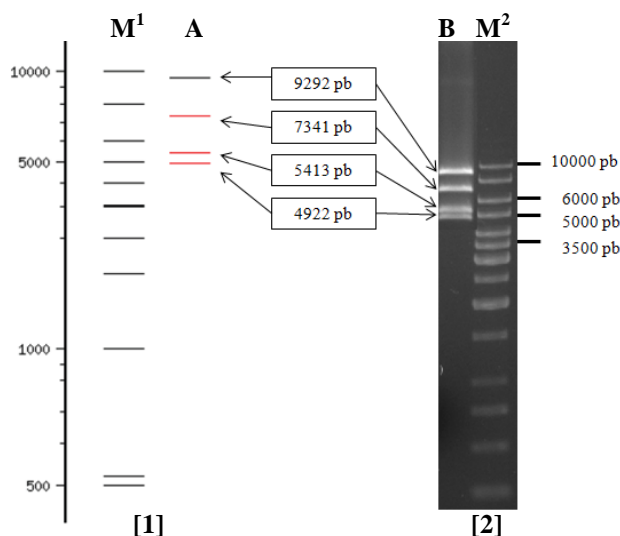


Figura 27. Comparação dos perfis de restrição com *EcoRI* [1] Perfil de bandas obtido com o programa NEBcutter V2.0 dos plasmídeos com perfil RT2 (96). M¹: Marcador 1kb; 1: SAP074A. (2) Electroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de restrição com *EcoRI* do plasmídeo de SM1. M²: marcador 1kb DNA Ladder GeneRuler™; 2: Perfil de restrição P1 - plasmídeo de SM1.

O facto do perfil P1 corresponder ao perfil RT2 anteriormente descrito por Shearer *et al.* (2011), permitiu confirmar a ampla distribuição geográfica e persistência temporal deste plasmídeo de *S. aureus*, tendo sido descrito em países como os Estados Unidos da América, Reino Unido e Austrália, entre 1949 e 2006 (96) e também em Portugal em 2007, altura em que foram isoladas as estirpes da colecção em estudo.

De seguida procedeu-se à cura do plasmídeo da estirpe SM1, de modo a correlacionar a sua presença com o fenótipo de resistência aos diferentes compostos antimicrobianos testados. Para isso, a estirpe SM1 foi sujeita a passagens sucessivas em TSB suplementado com clorpromazina até se obter uma cultura de SM1 curada do plasmídeo (SM1-curada).

No que diz respeito à resistência aos β -lactâmicos, observou-se um aumento da susceptibilidade a alguns antibióticos desta classe, com a cura do plasmídeo pSM1, apesar de se manter a classificação como resistente (Tabela 14 – Resultados). Uma vez que se trata de uma estirpe MRSA e os antibióticos para os quais se detectou alteração do halo de inibição foram a penicilina, ampicilina e amoxicilina-ácido clavulânico, não tendo ocorrido alteração do halo para a oxacilina, suspeitou-se que este pudesse resultar da presença do gene *blaZ* no plasmídeo pSM1. Esta hipótese é também suportada por se saber que os plasmídeos agrupados no perfil RT2 (96) contêm o gene *blaZ*. Assim foi analisada a capacidade de produção de β -lactamase pela estirpe SM1 e a estirpe SM1-curada, pelo teste da nitrocefina. Os resultados obtidos confirmaram que o determinante da β -lactamase se encontra no plasmídeo pSM1, uma vez que apenas a estirpe SM1 apresentou um resultado positivo (Figura 15 – Resultados). Este resultado foi ainda confirmado pela pesquisa do gene *blaZ* por PCR, tendo-se novamente obtido um resultado positivo apenas para a estirpe SM1 original (Figura 16 – Resultados).

A acção das β -lactamases constitui um dos mecanismos de resistência aos β -lactâmicos testados, nomeadamente, à penicilina, ampicilina e amoxicilina. No entanto, a estirpe SM1 é uma estirpe MRSA, o que implica que é resistente a todos os antibióticos da classe dos β -lactâmicos, incluindo as penicilinas semi-sintéticas como a oxacilina, pela acção de uma PBP adicional, a PBP2a, não se esperando que a perda do determinante *blaZ* afecte a resistência a estes β -lactâmicos (11, 24).

Ainda assim, observou-se um aumento da susceptibilidade aos β -lactâmicos penicilina, ampicilina e amoxicilina-ácido clavulânico, que pode estar relacionada com a perda do determinante *blaZ*. Esta observação pode dever-se ao facto dos genes que constituem o operão *bla* e que regulam a transcrição do determinante *blaZ* (*blaI* e

blaR1), poderem co-regular a expressão do gene *mecA* e consequentemente, a produção de PBP2a. Esta interacção entre sistemas reguladores deve-se à semelhança entre o operão *bla* e o elemento *mec*, na medida em que os genes reguladores da transcrição de *mecA*, o indutor *mecR1* e o repressor *mecI*, apresentam uma elevada homologia entre os genes que regulam a transcrição de *blaZ*, *blaR1* e *blaI* respectivamente (3, 10, 35).

Não se verificaram alterações no perfil de susceptibilidade aos restantes antibióticos testados da estirpe SM1 após a cura do plasmídeo, o que significa que os restantes fenótipos de resistência encontrados para esta estirpe resultarão de mecanismos de resistência mediados por determinantes cromossómicos.

Relativamente à susceptibilidade aos biocidas e metais pesados, apenas foram detectadas diferenças nos valores da CMI para o cádmio, visto que os valores de CMI das estirpes curadas são inferiores aos da estirpe SM1 original – 0,015 mM e 0,06 mM respectivamente (Tabela 15 – Resultados). Neste ponto, é importante salientar três aspectos: (i) não existem valores de *breakpoints* padronizados que permitam classificar uma estirpe como resistente ou sensível ao cádmio, o mesmo se passando para os outros metais e biocidas testados; (ii) por esta razão também não existe um valor que estabeleça o limite entre um nível de resistência alto e baixo. Verifica-se que estes valores são normalmente estabelecidos pelos autores dos estudos publicados. No caso do cádmio, a definição de nível alto ou baixo de resistência é normalmente determinado pela comparação entre valores de CMI observados para estirpes com diferentes determinantes de resistência (21, 67); (iii) a comparação entre os valores de CMI obtidos no presente estudo e aqueles descritos na literatura também não pode ser realizada com total exactidão com aqueles observados na literatura, uma vez que estas concentrações não foram determinadas através dos mesmos métodos.

Tendo em conta os pontos acima mencionados, considerou-se que o fenótipo de resistência ao cádmio da estirpe SM1 é de baixo nível, dado que o valor de CMI obtido é apenas 4 vezes superior ao das estirpes curadas. Comparando os resultados obtidos para a estirpe SM11 e a para a respectiva estirpe curada, SM11-P11C3, verifica-se que a diferença entre as respectivas CMIs é de 128 vezes (Tabela 17 – Resultados). Assim, é possível deduzir que o plasmídeo presente na estirpe SM1, pSM1, contém um determinante responsável por baixos níveis de resistência ao cádmio, tendo por essa razão sido pesquisada a presença do gene *cadD*, que se sabe ser responsável por este fenótipo, e que já foi identificado em diferentes plasmídeos de *S. aureus*. Este determinante codifica uma bomba de efluxo, sobre o qual ainda não existem muitos

dados a nível estrutural e funcional (21, 40, 49, 67, 79, 115). Apesar dos métodos de determinação dos valores de CMI serem diferentes, o aumento da susceptibilidade ao cádmio após a cura do plasmídeo pSM1 coincide com o que foi demonstrado noutros estudos acerca do determinante *cadD*, em que o nível de resistência ao cádmio conferido por este determinante é inferior quando comparado com o associado ao determinante *cadA* (21, 67, 79). Esta comparação foi possível devido aos resultados obtidos para a estirpe SM11 e a estirpe SM11-curada.

É também importante salientar que não existem muitas publicações que abordem os pontos mencionados anteriormente e especialmente acerca do determinante *cadD*, o que dificulta a tarefa da determinação do fenótipo das estirpes em estudo, relativamente à resistência ao cádmio (21, 49, 67, 79, 115).

Os resultados obtidos confirmaram que o determinante *cadD* se encontra no plasmídeo pSM1, uma vez que a estirpe SM1 apresentou um resultado positivo após a pesquisa do gene por PCR, em oposição ao resultado negativo obtido para a estirpe curada (Figura 17 – Resultados).

Em resumo, foi possível determinar a presença dos determinantes *blaZ* e *cadD* no plasmídeo pSM1 e associá-los às resistências aos β -lactâmicos (penicilina, ampicilina e amoxicilina-ácido clavulânico) e à susceptibilidade reduzida ao cádmio, respectivamente. A detecção simultânea destes dois genes no plasmídeo pSM1 vai ao encontro dos resultados de Shearer e colegas, que referem a presença destes dois determinantes nos plasmídeos agrupados no perfil RT2 (96). Este resultado vem também ao encontro de outros estudos que referem a presença simultânea do determinante *blaZ* (juntamente com o gene repressor *blaI* e o gene indutor *blaRI*) e do gene *cadD* no mesmo plasmídeo, bem como de outros determinantes de resistência e virulência, presença essa que poderá ser motivo de estudos adicionais de pSM1 no futuro (21, 49, 67, 79, 96, 115).

• Estudo do plasmídeo pSM11 – Perfil P2

A digestão dos plasmídeos isolados das estirpes SM11 e SM13 com as enzimas *AccI* e *EcoRI* (Figuras 5 e 8 – Resultados) confirmou que se trata de um plasmídeo com o mesmo perfil de restrição, tendo sido classificado no perfil P2. Este plasmídeo é maior do que o plasmídeo pSM1, estimando-se que tenha 36,6 kb. Este valor foi calculado com base na soma dos tamanhos dos fragmentos obtidos após a digestão com *EcoRI*, em

que foi possível distinguir um maior número de fragmentos de restrição, face ao perfil de bandas obtidas com *AccI*.

No que diz respeito ao perfil de resistência aos antibióticos, não foram detectadas diferenças entre os fenótipos das estirpes SM11 e SM11-curada (Tabela 16 – Resultados). Isto indica que o plasmídeo não inclui nenhum determinante que confira resistências aos antibióticos testados no âmbito deste trabalho. Porém, uma vez que não se determinou a sequência do plasmídeo pSM11, não é possível descartar a hipótese de existirem neste plasmídeo determinantes associados à resistência a outros antibióticos que não tenham sido testados no decurso deste estudo.

Quanto ao perfil de resistência aos biocidas, não se observaram diferenças nos valores de CMI obtidos para os compostos testados entre a estirpe SM11 original e a estirpe SM11-curada, não havendo por isso diferenças no fenótipo de susceptibilidade. Contudo, verificaram-se diferenças entre os níveis de susceptibilidade das duas estirpes aos metais pesados, em particular para o cádmio e o zinco, embora a diferença seja maior no caso do cádmio (Tabela 17 – Resultados).

Tendo em conta o referido anteriormente acerca da resistência ao cádmio (página 74), quando analisados os valores de CMI obtidos para as estirpes curadas dos plasmídeos pSM1 e pSM11, considerou-se que o último estará associado a resistência de alto nível a este composto, uma vez que a CMI do cádmio para a estirpe SM11 é 128 vezes maior que a da estirpe SM11-curada (respectivamente, 1 mM e 0,0075 mM). Adicionalmente, foi também observada uma alteração nos valores de CMI do zinco para a estirpe SM11-curada, sendo a sua CMI 4 vezes menor do que a estirpe original (0,25 mM e 1mM, respectivamente). Foi por isso considerado que a estirpe SM11 apresenta um nível baixo de resistência ao zinco.

A análise destes resultados sugere que o plasmídeo pSM11 poderá transportar dois determinantes distintos, um capaz de conferir resistência de alto nível ao cádmio e outro associado a resistência de baixo nível ao zinco ou, alternativamente, um só determinante que codifique uma proteína capaz de conferir simultaneamente estes dois fenótipos de resistência, sendo este segundo caso a situação mais frequentemente descrita para *S. aureus* (9, 38, 62).

De acordo com os estudos publicados, esse determinante seria o *cadA*, que codifica uma bomba de efluxo, CadA. Esta corresponde a uma proteína com 727 aminoácidos que demonstra semelhanças com as ATPases da classe P. Assim, o determinante *cadA* codifica uma ATPase que utiliza directamente a energia resultante da hidrólise do

ATP para expulsar da célula diferentes compostos, que incluem o cádmio, zinco e chumbo (21, 38, 62, 78, 82, 99, 117).

A presença deste gene foi confirmada através da amplificação por PCR de um fragmento interno ao gene *cadA*, sendo possível observar a ausência do mesmo na estirpe curada (Figura 20 – Resultados). Sabe-se também que o fenótipo de resistência de alto nível ao cádmio e de baixo nível ao zinco observado para a estirpe SM11, só é possível devido à presença não só do gene *cadA* mas também do seu regulador *cadC* (21, 99, 118), que neste caso não foi detectado pelo ensaio de PCR uma vez que os *primers* utilizados são específicos para amplificação de *cadA*.

Por esta razão e também de forma a perceber se existem outros genes de resistência a antibióticos, seria interessante no futuro estudar mais aprofundadamente este plasmídeo e, em concreto, determinar a sua sequência completa, visto que a presença do determinante *cadA* em plasmídeos está muitas vezes associada a outros determinantes de resistência a compostos antimicrobianos (62). Um exemplo é o plasmídeo pI258 que apresenta também o determinante *blaZ* (78), determinante que se sabe não estar presente em pSM11, uma vez que as estirpes SM11 original e curada apresentam um resultado positivo no teste da nitrocefina (dados não apresentados), o que indica que este determinante deverá estar no cromossoma (81). Um outro caso é dado pela presença simultânea dos determinantes *cadA* e *cadB* (associado a um baixo nível de resistência ao cádmio) no plasmídeo pII147, em que o efeito do determinante *cadA* sobre a susceptibilidade ao cádmio dissimula a presença de *cadB*, visto que este confere um nível mais baixo de resistência ao cádmio, comparativamente a *cadA* (100).

• Estudo do plasmídeo pSM26 – Perfil P10

Dentro do conjunto de 11 perfis plasmídicos estabelecidos para a colecção de estirpes em estudo, apenas dois incluem um plasmídeo pequeno (< 3 kb): os perfis P7 e P10 (Figura 10 – Resultados). Assim, foram também seleccionadas, para uma caracterização mais detalhada, estirpes representativas de cada perfil, nomeadamente a estirpe SM4, com o perfil P7, e a estirpe SM26, a única que apresenta o perfil P10. As duas estirpes foram sujeitas ao processo de cura dos respectivos plasmídeos, seguindo a estratégia anteriormente utilizada. No entanto e apesar de várias tentativas, apenas foi identificada uma estirpe potencialmente curada a partir de SM26, a estirpe SM26-P11C35 (Figura 22 – Resultados).

pSM26 trata-se de um plasmídeo de pequenas dimensões (de 2,6 kb de acordo com o perfil de restrição com *AccI*), que se insere na classe I dos plasmídeos de *Staphylococcus*, constituída por plasmídeos de pequenas dimensões (1 a 5 kb) e presentes na célula bacteriana em elevado número de cópias (77). Tendo em conta o tamanho estimado de pSM26, espera-se que à partida se trate de um plasmídeo críptico ou que apresente um único gene de resistência para compostos antimicrobianos (46, 64, 82).

Após a cura do plasmídeo pSM26 foram detectadas alterações significativas no antibiograma, nomeadamente a nível dos fenótipos de resistência à eritromicina e clindamicina.

O fenótipo de resistência aos macrólidos, lincosamidas e estreptograminas do tipo B é denominado MLS_B e pode ser induzido ou constitutivo (52, 53, 89). No caso da estirpe SM26, constata-se que o fenótipo de resistência é do tipo induzido. Isto porque esta estirpe apresenta resistência à eritromicina, um macrólido composto por 14 anéis, e aparente susceptibilidade à clindamicina e quinupristina/dalfopristina. Esta observação é característica do fenótipo MLS_{Bi} . A realização do “D-teste” permitiu confirmar que a estirpe SM26 apresenta uma resistência à clindamicina que é induzida pela eritromicina, dada a deformação do halo de inibição em redor deste antibiótico, formando um “D” (28, 52, 53, 89). Quando aplicado o mesmo procedimento à estirpe SM26-curada, verifica-se que a estirpe perde a resistência à eritromicina perdendo consequentemente, a resistência induzida à clindamicina (Figura 24 – Resultados). Isto permite confirmar que o plasmídeo pSM26 está envolvido na resistência a estes dois antibióticos. É de salientar que apesar de o fenótipo MLS_B estar também associado à resistência às estreptograminas B, não foi observada resistência à quinupristina/dalfopristina tanto na estirpe SM26 original como na curada. No entanto, este antibiótico é composto por uma combinação dos dois tipos de estreptograminas, isto é, uma estreptogramina do tipo A – dalfopristina – e uma do tipo B – quinupristina – e a resistência a esta combinação permanece um acontecimento raro (53).

Tendo em conta estas observações, foi feita a pesquisa, através de amplificação por PCR, do determinante plasmídico responsável por conferir o fenótipo MLS_{Bi} , tendo-se pesquisado os genes *ermB* e *ermC*. A escolha destes genes teve em conta (i) o facto de os genes do tipo *erm* (*erythromycin ribosome methylase*), incluindo *ermB* e *ermC*, serem responsáveis pelo fenótipo MLS_{Bi} ; (ii) a presença destes dois genes se encontrar descrita em plasmídeos de *S. aureus*, mais concretamente em plasmídeos de pequenas

dimensões (50, 53, 59, 62, 77, 90, 114); (iii) serem os genes do tipo *erm* mais prevalentes em *S. aureus*, para além de *ermA*, cuja presença em *S. aureus* está apenas descrita no cromossoma (2, 28, 52, 90, 93, 114). Estes genes codificam metilases de rRNA, que metilam um resíduo de adenina do 23S rRNA, o que por sua vez impede a ligação das três classes antibióticos à subunidade 50S do ribossoma, resultando na resistência do tipo MLS_B. Na resistência induzida, é produzido mRNA inactivo, incapaz de codificar as metilases. Este mRNA torna-se activo apenas após a exposição a um macrólido indutor, neste caso a eritromicina (2, 28, 50, 52, 89). Porém, há que ter em conta que os genes referidos, *ermA*, *ermB* e *ermC*, são também os mais frequentemente pesquisados, o que poderá de algum modo influenciar as frequências atribuídas a estes determinantes *erm* em *S. aureus* (2, 90, 93).

A pesquisa destes determinantes por PCR nas estirpes SM26 original e SM26-curada demonstrou que o gene presente no plasmídeo pSM26 é responsável pela resistência à eritromicina e resistência induzida à clindamicina na estirpe SM26 é o gene *ermC*.

Visto que após a cura do plasmídeo pSM26 não foram identificadas diferenças significativas para os restantes antibióticos nem nos valores de CMIs para os biocidas e metais pesados, o facto de se poder associar a resistência à eritromicina e a resistência induzida à clindamicina a um único determinante, vai ao encontro do esperado, visto tratar-se este de um plasmídeo de pequenas dimensões.

Em relação à resistência à clindamicina, importa ainda referir um aspecto adicional. Ao longo deste estudo detectaram-se 43 estirpes resistentes à clindamicina, 28 das quais apresentavam resistência induzida, 16 resistência constitutiva (resultado de “D-teste” negativo) e duas (SM35 e SM43) apresentavam simultaneamente resistência induzida e constitutiva, isto é, um resultado positivo no “D-teste” e também um fenótipo de resistência sem a colocação do disco de eritromicina nas proximidades do disco de clindamicina. Isto acontece porque o fenótipo MLS_{Bi} não é detectado através dos métodos de antibiograma convencionais, isto é, determinação de CMIs, Kirby-Bauer com colocação convencional dos discos de antibiótico, métodos automatizados ou E-test[®], o que pode significar que na prática laboratorial comum, em que se utilizam alguns destes métodos, as estirpes sejam classificadas erradamente como sensíveis à clindamicina (28, 52). A principal consequência da caracterização fenotípica incorrecta das estirpes é a selecção de estirpes com mutações na região promotora dos genes *erm*, neste caso *ermC*, que permitem a produção das metilases do ribossoma sem ser

necessária a acção de um indutor. Uma vez que estes mutantes são resistentes tanto à eritromicina como à clindamicina, quando aplicada a terapêutica com clindamicina esta é ineficaz o que pode implicar graves consequências no tratamento destas infecções (51, 52, 97).

- **Conclusões Gerais**

Os resultados obtidos ao longo do trabalho desenvolvido para esta tese evidenciam a importância dos plasmídeos no desenvolvimento de resistências a diferentes compostos antimicrobianos em estirpes de *S. aureus*.

Uma vez que a colecção de estirpes em estudo era extensa, assim como o número de perfis plasmídicos identificados, não foi possível determinar o contributo de todos estes plasmídeos para o perfil de susceptibilidade aos compostos antimicrobianos das estirpes em estudo. Ainda assim, uma vez que foram estudados alguns dos plasmídeos mais prevalentes da colecção, nomeadamente o plasmídeo pSM1, foi possível obter uma perspectiva razoável acerca do contributo dos determinantes plasmídicos no perfil de susceptibilidade.

Embora não exista um vasto registo deste tipo de estudos em Portugal, já em 1989 foi realizado um estudo semelhante, na medida em que incluía a análise dos plasmídeos de uma colecção de estirpes MRSA, também ela isolada num laboratório hospitalar de Lisboa, embora nesse trabalho tivesse sido analisada uma colecção de isolados consideravelmente maior (219 isolados) que a colecção aqui em estudo (72). No estudo de Melo Cristino *et al.* verificou-se foi que apesar de ter sido identificado um elevado número de isolados com plasmídeos, os perfis de resistência aos compostos antimicrobianos (nomeadamente antibióticos) não eram, na grande maioria, associados aos plasmídeos identificados (72). Além disso, os fenótipos de resistência correlacionados com os plasmídeos identificados por Melo Cristino *et al.*, são distintos dos encontrados nas estirpes da colecção em estudo. Apesar das diferenças entre os dois estudos, estas observações reforçam a importância destes EGMs para a disseminação destas estirpes em ambiente hospitalar, visto que a perda e/ou ganho de novos plasmídeos está associada a diferentes fenótipos de resistência que favorecem a sua manutenção nestes ambientes.

Tendo em conta os genes identificados no presente trabalho, verificou-se que o fenótipo de resistência ao cádmio é bastante frequente e foi inclusivamente detectado nos plasmídeos pSM1 e pSM11, apesar de, neste caso ser o resultado de determinantes

distintos (*cadD* e *cadA*, respectivamente). Ao contrário de alguns metais que são essenciais para o metabolismo de organismos procariontes e eucariontes, ainda que em concentrações muito baixas, o cádmio não é essencial para o desenvolvimento celular e é extremamente tóxico, mesmo a baixas concentrações (106). Este é um elemento muito raro e quando encontrado no ambiente está em concentrações residuais, podendo mesmo assim encontrar-se como contaminante, devido a processos industriais (*e.g.* desperdícios de produções mineiras, produção de ferro e aço, queima de combustíveis fósseis e de lixo doméstico), ao fumo do tabaco, à utilização de fertilizantes e pesticidas, entre outros (96, 106). Embora as estirpes em estudo tenham sido isoladas num laboratório hospitalar, isso não implica que todas as estirpes estudadas sejam de origem hospitalar, podendo incluir algumas estirpes adquiridas na comunidade. Havendo esta hipótese, e tendo em conta a (i) capacidade de transferência horizontal genética, por intermédio de plasmídeos, entre diferentes estirpes de *S. aureus*, inclusivamente de origem animal (112); (ii) o facto dos genes de resistência ao cádmio terem sido detectados em plasmídeos; e (iii) o facto do cádmio ser um agente poluente do meio ambiente, ser um dos constituintes do fumo do tabaco e poder estar presente como contaminante de solos e águas utilizados em meios agrícolas e pecuária (106), poderá explicar a disseminação destes determinantes, que poderão apresentar vantagens evolutivas para estas estirpes quando inseridas no meio ambiente. No entanto, estes genes (*cadA* e *cadD*) estão normalmente associados a plasmídeos que transportam também outros determinantes de resistência, nomeadamente genes de resistência aos β -lactâmicos (*blaZ*), não sendo por isso muito provável que o sucesso destas estirpes em ambientes hospitalares se deva à baixa susceptibilidade ao cádmio que conferem, tendo também em conta que um dos determinantes confere um nível de resistência baixo ao cádmio (*cadD*). Assim, será mais provável que tenha sido a associação entre os determinantes *cad* e *blaZ* o principal factor na disseminação dos determinantes *cad* e o fenótipo associado nestas estirpes, o que levanta a questão da potencial co-selecção de resistência entre antibióticos e metais pesados.

Observou-se também que a maioria das estirpes é constituída por plasmídeos de grandes dimensões, que normalmente transportam vários determinantes de resistência. Porém, no caso dos plasmídeos pSM1 e pSM11, verificou-se através da comparação entre os resultados do antibiograma e das CMI's das estirpes originais e as respectivas estirpes curadas, que a maioria dos fenótipos de resistência identificados não estava associada a determinantes plasmídicos. Isto significa que estes plasmídeos apresentam,

muito provavelmente, ou outros determinantes de resistência a compostos que não tenham sido testados (*e.g.* mercúrio) (62, 69) ou outro tipo de vantagens para a sobrevivência destas estirpes no ambiente, nomeadamente genes de virulência (*e.g.* genes codificadores de toxinas) (69, 96) ou de transferência por conjugação (*e.g.* genes *tra*) (77). Por esta razão, seria de interesse no futuro realizar um estudo mais aprofundado dos plasmídeos pSM1 e pSM11, além dos restantes plasmídeos não abordados nesta dissertação, através do estudo das sequências nucleotídicas e da análise da sua eventual associação com um conjunto mais alargado de agentes antimicrobianos. Seria também interessante aplicar a abordagem experimental utilizada, ao estudo das estirpes com mais do que um plasmídeo, de forma a confirmar se os plasmídeos identificados isoladamente são comuns entre diferentes perfis e quais as resistências, se presentes, associadas a cada um.

Outro resultado importante foi a cura de um dos plasmídeos de pequenas dimensões, pSM26, através do método de passagens sucessivas com clorpromazina, e a consequente associação do fenótipo MLS_{Bi} ao determinante plasmídico *ermC*. Nestes casos é muito importante a correcta atribuição do fenótipo de resistência induzida, uma vez que a resistência induzida à clindamicina é uma das principais razões para o insucesso terapêutico deste antibiótico (28, 52, 116). Por esta razão é tão importante e inclusivamente aconselhado por alguns autores como prática de rotina laboratorial, a realização do “D-teste” em casos de infecção por estirpes de *S. aureus* resistentes à eritromicina. Uma vez que o fenótipo de resistência à eritromicina pode dever-se a outros mecanismos (*e.g.* bombas de efluxo e modificação enzimática), o “D-teste” é um bom prognóstico para o aparecimento de resistência constitutiva à clindamicina por intermédio de mutações que tornam a terapêutica com este antibiótico inútil (51, 52, 97, 116).

Considerando os resultados descritos nesta dissertação, existem ainda muitos caminhos por explorar no que diz respeito aos plasmídeos e ao seu contributo para o sucesso na disseminação de resistências em *S. aureus*, uma vez que são uma principais formas de transferência de genes nesta bactéria. A importância destes EGMs não está somente relacionada com a disseminação de determinantes de resistência, mas também associada com o transporte de outros genes igualmente importantes para o sucesso da sua disseminação, como por exemplo genes associados a virulência que codificam para toxinas, entre outros, que não foram abordados ao longo deste estudo. Desta forma seria interessante, no futuro, direccionar o estudo destes plasmídeos de modo a incluir também

a detecção de genes de virulência, de modo a obter uma visão mais abrangente do seu papel nas estirpes que os transportam.

Nos últimos anos a investigação acerca dos plasmídeos de *Staphylococcus* spp. tem vindo a ganhar um novo fôlego, havendo especial interesse no conhecimento mais aprofundado acerca dos seus mecanismos de transferência e dos genes de resistência e/ou virulência que podem transportar e transferir, particularmente entre estirpes de origem humana e animal ou mesmo entre diferentes espécies.

5 Referências Bibliográficas

1. Akimitsu, N., H. Hamamoto, R. Inoue, M. Shoji, A. Akamine, K. Takemori, N. Hamasaki and Sekimizu, K. 1999. Increase in resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to β -lactams caused by mutations conferring resistance to benzalkonium chloride, a disinfectant widely used in hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 3042–3043.
2. Aktas, Z., A. Aridogan, C. B. Kayacan and D. Aydin. 2007. Resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics in staphylococci isolated in Istanbul, Turkey. *J. Microbiol.* **45**:286–290.
3. Arêde, P., J. Ministro and D. C. Oliveira. 2013. Redefining the role of the β -lactamase locus in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: β -lactamase regulators disrupt the MecI-mediated strong repression on *mecA* and optimize the phenotypic expression of resistance in strains with constitutive *mecA*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**:3037–3045.
4. Bennett, P. M. 2008. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br. J. Pharmacol.* **153** Suppl:S347–357.
5. Berg, T., N. Firth, S. Apisiridej, A. Hettiaratchi, A. Leelaporn and R. A. Skurray. 1998. Complete nucleotide sequence of pSK41: evolution of staphylococcal conjugative multiresistance plasmids. *J. Bacteriol.* **180**:4350–4359.
6. Brown, M. H. and R. A. Skurray. 2001. Staphylococcal multidrug efflux protein QacA. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**:163–170.
7. Buffet-bataillon, S., P. Tattevin, M. Bonnaure-mallet and A. Jolivet-gougeon. 2012. Emergence of resistance to antibacterial agents: the role of quaternary ammonium compounds - a critical review. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **39**:381–389.
8. Casey, A. L., P. A. Lambert and T. S. J. Elliott. 2007. Staphylococci. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **29** Suppl 3:S23–32.

9. **Cavaco, L. M., H. Hasman, M. Stegger, P. S. Andersen, R. Skov, A. C. Fluit, T. Ito and F. M. Aarestrup.** 2010. Cloning and occurrence of *czrC*, a gene conferring cadmium and zinc resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**:3605–3608.
10. **Chambers, H. F.** 1997. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**:781–791.
11. **Chambers, H. F. and F. R. Deleo.** 2009. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**:629–641.
12. **Champoux, J. J., W. L. Drew, F. C. Neidhardt and J. J. Plorde.** 2003. Sherris Medical Microbiology 4th ed. Coordinating ed. Ryan K. J. and Ray C. G. McGraw-Hill. United States of America.
13. **Chapman, J. S.** 2003. Biocide resistance mechanisms. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **51**:133–138.
14. **Chapman, J. S.** 2003. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. *Int. Biodeterior. Biodegradation.* **51**:271–276.
15. **Chaves, F., J. Garcia-Martinez, S. de Miguel, J. R. Otero.** 2004. Molecular characterization of resistance to mupirocin in methicillin-susceptible and -resistant isolates of *Staphylococcus aureus* from nasal samples. *J. Clin. Microbiol.* **42**:822–824.
16. **Chung, M., H. de Lencastre, P. Matthews, A. Tomasz, I. Adamsson, M. Aires de Sousa, T. Camou, C. Cocuzza, A. Corso, I. Couto, A. Dominguez, M. Gniadkowski, R. Goering, A. Gomes, K. Kikuchi, A. Marchese, R. Mato, O. Melter, D. Oliveira, R. Palacio, R. Sá-Leão, I. Santos Sanches, J. H. Song, P. T. Tassios and P. Villari.** 2000. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. *Microb. Drug Resist.* **6**:189–198.
17. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2012. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Sixteenth Informational

Supplement M100-S16. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa, E.U.A.

18. **Costa, S. S.** 2013. Eflux pump activity in drug resistance of *Staphylococcus aureus*. Tese de Doutoramento. Universidade Nova de Lisboa.
19. **Costa, S. S., C. Falcão, M. Viveiros, D. Machado, M. Martins, J. Melo-Cristino, L. Amaral and I. Couto.** 2011. Exploring the contribution of efflux on the resistance to fluoroquinolones in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. BMC Microbiol. **11**:241.
20. **Costa, S. S., E. Ntokou, A. Martins, M. Viveiros, S. Pournaras, I. Couto, and L. Amaral.** 2010. Identification of the plasmid-encoded *qacA* efflux pump gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain HPV107, a representative of the MRSA Iberian clone. Int. J. Antimicrob. Agents. **36**:557-561.
21. **Crupper, S. S., V. Worrell, G. C. Stewart, and J. J. Iandolo.** 1999. Cloning and expression of *cadD*, a new cadmium resistance gene of *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. **181**:4071–4075.
22. **Davies, J. and D. Davies.** 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **74**:417–433.
23. **Denyer, S. and G. Stewart.** 1998. Mechanisms of action of disinfectants. Int. Biodeterior. **41**:261–268.
24. **Deresinski, S.** 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey. Clin. Infect. Dis. **40**:562–73.
25. **European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.** Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, Version 1.3, 2011. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints (Acedido em Outubro de 2012).
26. **Euzébi, J. P.** 1997-2013. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. <http://www.bacterio.cict.fr> (Acedido em Setembro de 2013).

27. **Falcão, C. M.** 2009. Importância dos sistemas de efluxo na resistência às fluoroquinolonas em *Staphylococcus aureus*. Tese de Mestrado em Microbiologia Médica. Universidade Nova de Lisboa.
28. **Fiebelkorn, K. R., S. A. Crawford, M. L. McElmeel and J. H. Jorgensen.** 2003. Practical disk diffusion method for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* **41**:4740–4744.
29. **Firth, N. and R. A. Skurray.** 1998. Mobile elements in the evolution and spread of multiple-drug resistance in staphylococci. *Drug Resist. Updat.* **1**:49–58.
30. **Firth, N., S. Apisiridej, T. Berg, B. A. O'Rourke, S. Curnock, K. G. H. Dyke and R. A. Skurray.** 2000. Replication of staphylococcal multiresistance plasmids. *J. Bacteriol.* **182**:2170–2178.
31. **Frost, L. S., R. Leplae, A. O. Summers and A. Toussaint.** 2005. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**:722–732.
32. **Gilbert, P. and A. J. McBain.** 2003. Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**:189–208.
33. **Gnanadhas, D. P., S. A. Marathe D. Chakravorty.** 2013. Biocides - resistance, cross-resistance mechanisms and assessment. *Expert Opin. Investig. Drugs.* **22**:191–206.
34. **Götz, F., T. Bannerman and K. Schleifer.** 2006. The Genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*. P.5-75. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. Schleifer, E. Stackebrandt (Third Edition). The Prokaryotes: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria, Vol. 4. Springer, New York, USA.
35. **Hackbarth, C. J. and H. F. Chambers.** 1993. *blaI* and *blaR1* regulate beta-lactamase and PBP 2a production in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:1144–1149.

- 36. Hallin, M., R. De Mendonça, O. Denis, A. Lefort, F. El Garch, P. Butaye, K. Hermans and M. J. Struelens.** 2011. Diversity of accessory genome of human and livestock-associated ST398 methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Infect. Genet. Evol.* **11**:290–299.
- 37. Hancock, R. E.** 2005. Mechanisms of action of newer antibiotics for Gram-positive pathogens. *Lancet Infect. Dis.* **5**:209–218.
- 38. Hantke, K.** 2001. Bacterial zinc transporters and regulators. *Biometals.* **14**:239–249.
- 39. Hogan, D. and R. Kolter.** 2002. Why are bacteria refractory to antimicrobials? *Curr. Opin. Microbiol.* **5**:472–477.
- 40. Holden, M. T.G., E. J. Feil, J. A. Lindsay, S. J. Peacock, N. P. J. Day, M. C. Enright, T. J. Foster, C. E. Moore, L. Hurst, R. Atkin, A. Barron, N. Bason, S. D. Bentley, C. Chillingworth, T. Chillingworth, C. Churcher, L. Clark, C. Corton, A. Cronin, J. Doggett, L. Dowd, T. Feltwell, Z. Hance, B. Harris, H. Hauser, S. Holroyd, K. Jagels, K. D. James, N. Lennard, A. Line, R. Mayes, S. Moule, K. Mungall, D. Ormond, M. A. Quail, E. Rabbino-witsch, K. Rutherford, M. Sanders, S. Sharp, M. Simmonds, K. Stevens, S. Whitehead, B. G. Barrell, B. G. Spratt and J. Parkhill.** 2004. Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**:9786–9791.
- 41. Hooper, D. C.** 2002. Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci. *Lancet Infect. Dis.* **2**:530–538.
- 42. Jensen, L. B., L. Garcia-Migura, A. J. S. Valenzuela, M. Løhr, H. Hasman and F. M. Aarestrup.** 2010. A classification system for plasmids from enterococci and other Gram-positive bacteria. *J. Microbiol. Methods.* **80**:25–43.
- 43. Jensen, S. O. and B. R. Lyon.** 2009. Genetics of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future microbiology* **4**:565–582.

44. **Jensen, S. O., S. Apisiridej, S. M. Kwong, Y. H. Yang, R. A. Skurray and N. Firth.** 2010. Analysis of the prototypical *Staphylococcus aureus* multiresistance plasmid pSK1. *Plasmid*. **64**:135–142.
45. **Kelly, B. G., A. Vespermann and D. J. Bolton.** 2009. The role of horizontal gene transfer in the evolution of selected foodborne bacterial pathogens. *Food Chem. Toxicol.* **47**:951–968.
46. **Khan, S. A.** 2005. Plasmid rolling-circle replication: highlights of two decades of research. *Plasmid* **53**:126–136.
47. **Köck, R., K. Becker, B. Cookson, J. E. van Gemert-Pijnen, S. Harbarth, J. Kluytmans, M. Mielke, G. Peters, R. L. Skov, M. J. Struelens, E. Tacconelli, A. Navarro Torné, W. Witte and A. W. Friedrich.** 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Euro Surveill.* **15**:19688.
48. **Kohanski, M. A., D. J. Dwyer and J. J. Collins.** 2010. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**:423–435.
49. **Kuroda, M., T. Ohta, I. Uchiyama, T. Baba, H. Yuzawa, I. Kobayashi, L. Cui, A. Oguchi, K. Aoki, Y. Nagai, J. Lian, T. Ito, M. Kanamori, H. Matsumaru, A. Maruyama, H. Murakami, A. Hosoyama, Y. Mizutani-Ui, N. K. Takahashi, T. Sawano, R. Inoue, C. Kaito, K. Sekimizu, H. Hirakawa, S. Kuhara, S. Goto, J. Yabuzaki, M. Kanehisa, A. Yamashita, K. Oshima, K. Furuya, C. Yoshino, T. Shiba, M. Hattori, N. Ogasawara, H. Hayashi and K. Hiramatsu.** 2001. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Lancet*. **357**:1225–1240.
50. **Leclercq, R.** 2002. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin. Infect. Dis.* **34**:482–492.
51. **Levin, T. P., B. Suh, P. Axelrod, A. L. Truant and T. Fekete.** 2005. Potential clindamycin resistance in clindamycin-susceptible, erythromycin-resistant *Staphylococcus aureus*: report of a clinical failure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:1222–1224.

- 52. Lewis, J. S. and J. H. Jorgensen.** 2005. Inducible clindamycin resistance in *Staphylococci*: should clinicians and microbiologists be concerned? *Clin. Infect. Dis.* **40**:280–285.
- 53. Lina, G., A. Quaglia, M. Reverdy, R. Leclercq, F. Vandenesch and J. Etienne.** 1999. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among *staphylococci*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1062–1066.
- 54. Lindsay, J. A.** 2010. Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*. *Int J. Med. Microbiol.* **300**:98–103.
- 55. Lindsay, J. A. and M. T. G. Holden.** 2004. *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? *Trends Microbiol.* **12**:378–385.
- 56. Lindsay, J. A. and M. T. G. Holden.** 2006. Understanding the rise of the superbug: investigation of the evolution and genomic variation of *Staphylococcus aureus*. *Funct. Integr. Genomics.* **6**:186–201.
- 57. Lindsay, J. A., G. M. Knight, E. L. Budd and A. J. McCarthy.** 2012. Shuffling of mobile genetic elements (MGEs) in successful healthcare-associated MRSA (HA-MRSA). *Mob. Genet. Elements.* **2**:239–243.
- 58. Liu, M. A., S. M. Kwong, S. O. Jensen, A. J. Brzoska and N. Firth.** 2013. Biology of the staphylococcal conjugative multiresistance plasmid pSK41. *Plasmid.* **70**:42–51.
- 59. Lodder, G., C. Werckenthin, S. Schwarz and K. Dyke.** 1997. Molecular analysis of naturally occurring *ermC*-encoding plasmids in *staphylococci* isolated from animals with and without previous contact with macrolide/lincosamide antibiotics. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **18**:7–15.
- 60. Lowy, F. D.** 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.* **339**:520–532.
- 61. Lowy, F. D.** 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Invest.* **111**:1265–1273.

- 62. Lyon, B. R. and R. Skurray.** 1987. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. Microbiol. Rev. **51**:88–134.
- 63. Madigan, M. T., J. M. Martinko, A. S. David and D. P. Clark.** 2010. Brock Biology of Microorganisms 13th ed. Coordinating ed. B. Cummings. Pearson Education, San Francisco, CA.
- 64. Malachowa, N. and F. R. DeLeo.** 2010. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. Cell. Mol. Life Sci. **67**:3057–3071.
- 65. Maltezou, H. C. and H. Giamarellou.** 2006. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. Int. J. Antimicrob. Agents. **27**:87–96.
- 66. Martinez, J. L., M. B. Sánchez, L. Martínez-Solano, A. Hernandez, L. Garmendia, A. Fajardo and C. Alvarez-Ortega.** 2009. Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. FEMS Microbiol. Rev. **33**:430–449.
- 67. Massidda, O., M. Mingoia, D. Fadda, W. B. Whalen, M. P. Montanari and P. E. Varaldo.** 2006. Analysis of the beta-lactamase plasmid of borderline methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*: focus on *bla* complex genes and cadmium resistance determinants *cadD* and *cadX*. Plasmid. **55**:114–127.
- 68. McAdow, M., D. M. Missiakas and O. Schneewind.** 2012. *Staphylococcus aureus* secretes coagulase and von Willebrand factor binding protein to modify the coagulation cascade and establish host infections. J. Innate Immun. **4**:141–148.
- 69. McCarthy, A. J. and J. A. Lindsay.** 2012. The distribution of plasmids that carry virulence and resistance genes in *Staphylococcus aureus* is lineage associated. BMC Microbiol. **12**:104.
- 70. McDonnell, G. and A. D. Russell.** 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. Clin. Microbiol. Rev. **12**:147–179.
- 71. Melo-Cristino, J. A.** 2000. *Staphylococcus*. p39-49. In W.F.C. Ferreira and J.C.F. de Sousa (1^a edição.) Microbiologia, vol.2. Lidel-edições técnicas, Lisboa.

- 72. Melo-Cristino, J. A. and A. T. Pereira.** 1989. Plasmid analysis of 219 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains with uncommon profiles isolated in Lisbon. J. Hosp. Infect. **13**:133–141.
- 73. Meyer, B. and B. Cookson.** 2010. Does microbial resistance or adaptation to biocides create a hazard in infection prevention and control? J. Hosp. Infect. **76**:200–205.
- 74. Milheirício, C., A. Portelinha, L. Krippahl, H. de Lencastre and D. C. Oliveira.** 2011. Evidence for a purifying selection acting on the β -lactamase locus in epidemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. BMC Microbiol. **11**:76.
- 75. Morente, E. O., M. A. Fernández-fuentes, M. José, G. Burgos, H. Abriouel, R. P. Pulido and A. Gálvez.** 2013. Biocide tolerance in bacteria. Int. J. Food. Microbiol. **162**:13–25.
- 76. Mourato, C.** 2012. A Contribuição das Bombas de Efluxo QacA e Smr para a multirresistência em *Staphylococcus aureus*. Tese de Mestrado em Microbiologia Médica. Universidade Nova de Lisboa.
- 77. Novick, R. P.** 1989. Staphylococcal plasmids and their replication. Annu. Rev. Microbiol. **43**:537–565.
- 78. Nucifora, G., L. Chu, T. K. Misra and S. Silver.** 1989. Cadmium resistance from *Staphylococcus aureus* plasmid pI258 *cadA* gene results from a cadmium-efflux ATPase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **86**:3544–3548.
- 79. O'Brien, F. G., C. Price, W. B. Grubb and J. E. Gustafson.** 2002. Genetic characterization of the fusidic acid and cadmium resistance determinants of *Staphylococcus aureus* plasmid pUB101. J. Antimicrob. Chemother. **50**:313–321.
- 80. O'Neill, A. J., F. McLaws, G. Kahlmeter, A. S. Henriksen and I. Chopra.** 2007. Genetic basis of resistance to fusidic acid in staphylococci. Antimicrob. Agents Chemother. **51**:1737–1740.

- 81. Olsen, J. E., H. Christensen and F. M. Aarestrup.** 2006. Diversity and evolution of *blaZ* from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**:450–460.
- 82. Paulsen, I. T., N. Firth, and R. A. Skurray.** 1997. Resistance to antimicrobial agents other than β -lactams, p. 175–212. *In* K. B. Crossley and G. L. Archer (ed.), *The Staphylococci in human disease*. Churchill Livingstone, New York, U.S.A.
- 83. Pérez-Roth, E., S. M. Kwong, J. Alcoba-Florez, N. Firth and S. Méndez-Alvarez.** 2010. Complete nucleotide sequence and comparative analysis of pPR9, a 41.7-kilobase conjugative staphylococcal multiresistance plasmid conferring high-level mupirocin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**:2252–2257.
- 84. Piddock, L.** 2006. Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**:629–636.
- 85. Plata, K., A. E. Rosato, G. Wegrzyn.** 2009. *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. *Acta Biochim. Pol.* **56**:597–612.
- 86. Poole, K.** 2002. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.* **36**:55S–64S.
- 87. Poole, K.** 2007. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Ann. Med.* **39**:162–176.
- 88. Putman, M., H. van Veen and W. Konings.** 2000. Molecular Properties of Bacterial Multidrug Transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**:672–693.
- 89. Roberts, M. C.** 2002. Resistance to tetracycline, macrolide-lincosamide-streptogramin, trimethoprim, and sulfonamide drug classes. *Mol. Biotechnol.* **20**:261–283.
- 90. Roberts, M. C.** 2012. Nomenclature Center for MLS genes. <http://faculty.washington.edu/marilynr> (Acedido em Agosto de 2013).
- 91. Russell, A. D.** 1997. Plasmids and bacterial resistance to biocides. *J Appl Microbiol.* **83**:155–165.

- 92. Russell, A. D.** 2002. Antibiotic and biocide resistance in bacteria: introduction. Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol. **31**:1S–3S.
- 93. Schmitz, F. J., J. Petridou, A. C. Fluit, U. Haddin, G. Peters and C. von Eiff.** 2000. Distribution of macrolide-resistance genes in *Staphylococcus aureus* blood-culture isolates from fifteen German university hospitals. M.A.R.S. Study Group. Multicentre Study on Antibiotic Resistance in Staphylococci. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Microbiology. **19**:385–387.
- 94. Schwarz, S., M. Cardoso and H. Blobel.** 1989. Plasmid-mediated chloramphenicol resistance in *Staphylococcus hyicus*. J. Gen. Microbiol. **135**:3329–3336.
- 95. Seah, C., D. C. Alexander, L. Louie, A. Simor, D. E. Low, J. Longtin and R. G. Melano.** 2012. MupB, a new high-level mupirocin resistance mechanism in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. **56**:1916–1920.
- 96. Shearer, J. E. S., J. Wireman, J. Hostetler, H. Forberger, J. Borman, J. Gill, S. Sanchez, A. Mankin, J. Lamarre, J. A. Lindsay, K. Bayles, A. Nicholson, F. O'Brien, S. O. Jensen, N. Firth, R. A. Skurray and Summers A. O.** 2011. Major families of multiresistant plasmids from geographically and epidemiologically diverse staphylococci. G3 (Bethesda). **1**:581–591.
- 97. Siberry, G. K., T. Tekle, K. Carroll and J. Dick.** 2003. Failure of clindamycin treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* expressing inducible clindamycin resistance in vitro. Clin. Infect. Dis. **37**:1257–1260.
- 98. Sidhu, M. S., E. Heir, T. Leegaard, K. Wiger and A. Holck.** 2002. Frequency of Disinfectant Resistance Genes and Genetic Linkage with β -Lactamase Transposon Tn552 among Clinical Staphylococci. Antimicrob. Agents Chemother. **46**:2797–2803.
- 99. Silver, S.** 1996. Bacterial resistances to toxic metal ions - a review. Gene. **179**:9–19.
- 100. Smith, K. and R. P. Novick.** 1972. Genetic studies on plasmid-linked cadmium resistance in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. **112**:761–772.

101. **Suller, M. and A. Russell.** 1999. Antibiotic and biocide resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococcus. *J. Hosp. Infect.* **43**:281–291.
102. **Tenover, F. C.** 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am. J. Med.* **119**:S3-S10.
103. **Theuretzbacher U.** 2011. Resistance drives antibacterial drug development. *Curr. Opin. Pharmacol.* **11**:433–438.
104. **Theuretzbacher, U.** 2012. Accelerating resistance, inadequate antibacterial drug pipelines and international responses. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **39**:295–299.
105. **Transatlantic Taskforce on Antimicrobial Resistance (TATFAR).** Recommendations for future collaboration between the U.S. and EU; 2011. <http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/tatfar-report.pdf> (Acedido em Agosto de 2013).
106. **Trevors, J. T., G. W. Stratton and G. M. Gadd.** 1986. Cadmium transport, resistance, and toxicity in bacteria, algae, and fungi. *Can. J. Microbiol.* **32**:447–64.
107. **Tupin, A., M. Gualtieri, F. Roquet-Banères, Z. Morichaud, K. Brodolin and J-P. Leonetti.** 2010. Resistance to rifampicin: at the crossroads between ecological, genomic and medical concerns. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **35**:519–523.
108. **van Belkum, A., P. T. Tassios, L. Dijkshoorn, S. Haeggman, B. Cookson, N. K. Fry, V. Fussing, J. Green, E. Feil, P. Gerner-Smidt, S. Brisse and M. Struelens.** 2007. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* **13 Suppl 3**:1–46.
109. **Vincze, T., J. Posfai and R. J. Roberts.** 2003. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucl. Acids Res.* **31**: 3688-3691.
110. **Walsh, C.** 2000. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature.* **406**:775–781.
111. **Webber, M. A.** 2002. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**:9–11.

- 112. Wendlandt, S., A. T. Feßler, S. Monecke, R. Ehricht, S. Schwarz and K. Kadlec.** 2013. The diversity of antimicrobial resistance genes among staphylococci of animal origin. *Int. J. Med. Microbiol.* **303**:338–349.
- 113. Wertheim, H. F. L., D. C. Melles, M. C. Vos, W. van Leeuwen, A. van Belkum, H. A. Verbrugh and J. L. Nouwen.** 2005. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect. Dis.* **5**:751–762.
- 114. Westh, H., D. M. Hougaard, J. Vuust, and V. T. Rosdahl.** 1995. Prevalence of *erm* gene classes in erythromycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated between 1959 and 1988. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:369–373.
- 115. Yamaguchi, T., T. Hayashi, H. Takami, M. Ohnishi, T. Murata, K. Nakayama, K. Asakawa, M. Ohara, H. Komatsuzawa and M. Sugai.** 2001. Complete nucleotide sequence of a *Staphylococcus aureus* exfoliative toxin B plasmid and identification of a novel ADP-ribosyltransferase, EDIN-C. *Infect. Immun.* **69**:7760–7771.
- 116. Yilmaz, G., K. Aydin, S. Iskender, R. Caylan and I. Koksai.** 2007. Detection and prevalence of inducible clindamycin resistance in staphylococci. *J. Med. Microbiol.* **56**:342–345.
- 117. Yoon, K. P. and S. Silver.** 1991. A second gene in the *Staphylococcus aureus* *cadA* cadmium resistance determinant of plasmid pI258. *J. Bacteriol.* **173**:7636–7642.
- 118. Yoon, K. P., T. K. Misra and S. Silver.** 1991. Regulation of the *cadA* cadmium resistance determinant of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. *J. Bacteriol.* **173**:7643–7649.